

Simultaner zytochemischer und autoradiographischer
Nachweis von T-Zellmarkern mittels Antikörper unter
besonderer Berücksichtigung der Zellanalyse bei
Graft-versus-Host Reaktion (GvH)

Dissertation

an der Fakultät für Biologie
der Ludwig Maximilians Universität München

durchgeführt am
Institut für Immunologie
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung
Leitung: Prof. Dr. S. Thierfelder

vorgelegt von

Mariastefania Antica

München, April 1987

1. Berichterstatter: Prof.Dr.F. Schwarzfischer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W. Gutensohn
Sonderberichterstatter: Prof.Dr.S. Thierfelder
Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juni 1987

"Man weiß nie, wohin das Qualitätsgleis führt.
Die Lösungen sind alle einfach - wenn man
sie gefunden hat.
Aber sie sind nur dann einfach, wenn man
sie schon kennt."

Robert M. Pirsig

Mojim roditeljima

INHALTSVERZEICHNIS

A	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.	<u>Einleitung und Begründung der Fragestellung</u>	1
2.	<u>Literaturübersicht über die T-Zelldifferenzierung</u>	2
2.1.	Differenzierungsantigene	2
2.2.	Thymus	5
2.2.1.	Thymusimmigration	6
2.2.2.	Thymuskinetik	7
2.2.3.	Charakteristiken der Thymuszellen	7
2.2.4.	T-Zell-Antigen-Rezeptor und MHC-Antigene	8
2.2.5.	T-Zelldifferenzierung	9
2.3.	Zellexport	12
3.	<u>Abkürzungen</u>	13
B	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	14
1.	<u>Material</u>	14
1.1.	Versuchstiere	14
1.2.	Zellen	14
1.3.	Antikörper	15
1.3.1.	Monoklonale Antikörper	15
1.3.2.	Polyklonale Antikörper	17
1.4.	Medien und Lösungen	17
2.	<u>Methoden</u>	18
2.1.	Bestrahlung	18
2.2.	Absorption der Antikörper	18
2.3.	Antikörper-Koppelung	18
2.3.1.	Tritium-Koppelung	18
2.3.2.	Biotin-Koppelung	19
2.4.	Radioimmunoassay	19
2.5.	Immunfluoreszenz	20
2.6.	Multispot-Adhäsion-Objektträger-Methode	20

2.6.1.	Herstellung der Objektträger mit PLL-beschichteten Bezirken	20
2.6.2.	Zellanheftung und Fixierung	23
2.6.3.	Inkubation mit Antikörper	23
2.6.4.	Doppelmarkierung mit zwei immunzytochemischen Methoden	25
2.7.	Autoradiographie	26
2.7.1.	Auflegen des Filmes auf die Objektträger	26
2.7.2.	Exponieren, Entwickeln, Fixieren und Färben der Filme	26
2.7.3.	Auswertung	27
2.8.	^3H -Thymidin-Einbau	28
C	<u>ERGEBNISSE</u>	29
1.	<u>Simultaner immunzytochemischer und immunautoradiographischer Nachweis von Leukozytenmarkern</u>	29
1.1.	Autoradiographie	29
1.1.1.	^3H -Koppelung der Antikörper	29
1.1.2.	Bestimmung des Sättigungsbereiches	30
1.1.3.	Expositionszeit	30
1.1.4.	Quantitative Tritium-Immunautoradiographie	32
1.2.	Doppelmarkierung	35
1.2.1.	Direkte Methode	35
1.2.2.	Die indirekte ("Sandwich") Methode	37
1.2.3.	Die optimalen Bedingungen	38
1.2.4.	Sensitivität der Methode	40
1.2.5.	Vergleich mit anderen Methoden	42
2.	<u>Klassifizierung von Mäuselymphozyten mittels Doppelmarkierung</u>	47
2.1.	Antigenverteilung bei den Mäusethymozyten	47
2.2.	Antigenverteilung bei Mäuse-Lymphknotenzellen	50
2.3.	Antigenverteilung bei Mäusemilzzellen	55

3.	<u>Anwendung der Doppelmarkierungsmethode für die</u>	57
	<u>Zellanalyse bei Graft-versus-Host Reaktion</u>	
3.1.	Nachweis der Lymphozyten des Spenders im Empfänger	58
	mit gleichzeitiger Bestimmung der Subpopulationen	
3.1.1.	Thy-1.1 und Thy-1.2.	58
3.1.2.	Lyt-1	61
3.1.3.	Lyt-2	64
D	<u>DISKUSSION</u>	65
1.	<u>Die Methode</u>	65
2.	<u>Zellanalyse bei der Maus</u>	68
3.	<u>Zellanalyse bei Graft-versus-Host-Reaktion</u>	73
E	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	78
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	81
	<u>SUMMARY</u>	103

1. Einleitung und Begründung der Fragestellung

Der Säugetierorganismus ist fähig, als Folge des Kontaktes mit Antigenen, zwei verschiedene Immunantworten zu bilden; entweder durch Synthese und Abgabe von löslichen Antikörpern in das Blut (humorale Immunantwort) oder Bildung von sensibilisierten Zellen (zellvermittelte Immunität). Für beide Arten der Immunantwort sind Lymphozyten von zentraler Bedeutung. Sie entwickeln sich aus der pluripotenten hämopoetischen Stammzelle, aus der auch alle andere Blutzellen entstehen. Die Stammzellen befinden sich in Leber und Milz (beim Fötus) und im Knochenmark (nach der Geburt) und wandern von dort zu zentralen lymphatischen Geweben (Thymus- und Bursa Fabricii-Äquivalent). Im Thymus entwickeln sie sich zu immunologisch kompetenten T-Lymphozyten, die die Träger der zellvermittelten Immunität darstellen. Die für die Synthese der zirkulierenden Antikörper verantwortlichen Zellen, B-Lymphozyten, entwickeln sich unabhängig vom Thymus in der Bursa Fabricii (bei Vögeln) oder im bursa-äquivalenten Organ (bei Menschen und anderen Säugetieren).

Morphologisch können die T- und B-Lymphozyten sogar im Elektronenmikroskop nicht unterschieden werden. Jedoch hat man heute die Möglichkeit, mit Hilfe von Antikörpern gegen unterschiedliche Plasmamembranproteine oder andere Marker, relativ einfach die zwei Zellpopulationen zu differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit soll eine neue Doppelmarkierungsmethode beschrieben werden, mit deren Hilfe die Lymphozyten besser charakterisiert und klassifiziert werden können. Darüberhinaus ist das Ziel unserer Untersuchungen, zwei markierte Antikörper auf derselben Zelle mit hoher Empfindlichkeit und Trennschärfe nachzuweisen.

Der Ansatz für die simultane Doppelmarkierung basiert auf der Kombination von Immunzytochemie und Autoradiographie, angewandt auf Einzelzellen.

Die neue Methode wird mit anderen Techniken verglichen, und ihre Vorteile werden diskutiert. Als Anwendungsbeispiel für diese Methode wurde eine Multiparameteranalyse durchgeführt, um die Lymphozytensubpopulation und ihre Entwicklungsstufen im Mäusethymus und in peripheren Organen genauer zu beschreiben. Die Entwicklung der T-Lymphozyten wird am Modell der Knochenmarkstransplantation und ihrer akuten GvH-Reaktion verfolgt. Außerdem wird mit dieser Methode der umstrittenen Frage nachgegangen, welche Zellen für die akute GvH-Reaktion verantwortlich sind.

2. Literaturübersicht über die T Zelldifferenzierung

2.1 Differenzierungsantigene

Einer der ersten beschriebenen Maus-Lymphozyten-Oberflächenmarker war das Theta (Θ)-Antigen (Reif und Allen, 1964), der später Thy-1 genannt wurde (Snell, 1971). Das Thy-1 ist auf Maus-Thymozyten und auf thymusabhängigen Zellen in Milz und Lymphknoten gefunden worden, aber auch auf Gehirn-, Epithel-Zellen und Fibroblasten (Scheid et al, 1972; Stern, 1973; Barclay et al, 1975; Hilgers et al, 1975).

Interessanterweise besteht das Thy-1-Antigen aus einer Immunglobulin-homologen Domäne, wie viele Lymphozytenmembranmoleküle, die für die Zellerkennung und Antigenbindung wichtig sind (Williams und Gagnon, 1982).

Da die Thy-1-Struktur während der Evolution konserviert wurde, und sie phylogenetisch sehr früh erscheint (schon bei Tunicaten), stellt sich die Frage, ob die ganze Familie Immunglobulin-ähnlicher Moleküle sich nicht aus diesen Zelloberflächenstrukturen entwickelt hat.

In Mäusen sind zwei Alloantigendeterminanten, Thy-1.1 und Thy-1.2, als Allele des "Thy-1"-Locus auf dem Chromosom 9 bekannt. Sie unterscheiden sich nur in einer Aminosäure. Thy-1.1 wurde auch auf den Ratten-Thymozyten und Stammzellen gefunden, während das Thy-1.2 bei keinem Rattenstamm vorkommt (Douglas, 1972).

Das Thy-1-Antigen ist ein Glykoprotein, das aus 112 (bei Ratten 111) Aminosäuren und drei Kohlehydraten besteht (Campbell et al, 1981; Williams und Gagnon, 1982). Diese Zucker-Reste machen 30% des Gewichtes des Moleküls aus. Sie beeinflussen die Migration von Thy-1 im SDS-Gel, was ein scheinbares Molekulargewicht von 25000-30000 Dalton ergibt. Das richtige Molekulargewicht des Gehirnantigens beträgt 17500 Dalton und des Thymozytenantigens 18700 Dalton (Kuchel et al, 1978).

Drei T-Lymphozyten-Differenzierungsantigene Lyt-1, Lyt-2 und Lyt-3 wurden von Boyse et al (1968, 1971) beschrieben. Genetische Analysen zeigten, daß sich der Lyt-1-Locus auf dem Maus-Chromosom 19 befindet (Itakura et al, 1974), während die Lyt-2- und Lyt-3-Loci eng miteinander auf Maus-Chromosom 6 verbunden sind (Itakura, 1972). Auf jedem Locus sind zwei Allele bekannt (Lyt-1.1., Lyt-1.2, Lyt-2.1, Lyt-2.2).

Das Mäuse-Lyt-1-Lymphozytenoberflächen-Glykoprotein wurde ursprünglich mittels konventioneller Antiseren im zytotoxischen Test definiert (Cantor und Boyse, 1977). Als solches schien es exklusiv auf T-Helferzellen vorzukommen. Da dieses Antigen auf anderen Zellen geringere Expressionsdichte hat, wurde es erst später mit einer Sensitivitätssteigerung der Nachweismethoden auch auf allen anderen T-Zellen, unabhängig von funktionellen Subklassen, gefunden (Ledbetter et al, 1980). Darüberhinaus wurde dieses Antigen mit Lyt-1 (Lymphozyten T) bezeichnet und als pan-T Marker verwendet. Es entspricht dem T1-Antigen bei Menschen (Ledbetter et al, 1981a). Eine biochemische Charakterisierung des Lyt-1-Antigens zeigte, daß es sich um eine einzige Polypeptidkette vom MG 70000 Dalton handelt (Durda

et al, 1978; Ledbetter und Herzenberg, 1979). Befunde in biologischen Assays, die durch gegen diese Struktur gerichtete monoklonale Antikörper beeinflußt werden können, lassen eine funktionelle Rolle des Lyt-1-Antigens annehmen. Anti-Lyt-1-Antikörper erhöhen die allogene- oder lektininduzierte Lymphozytenproliferation (Hollander 1981, 1982), was mit einer Steigerung der IL-2-Produktion in diesen Kulturen assoziiert ist.

Die starke Ausprägung des Lyt-1 Antigens bei Zellen, die über Nacht mit PHA inkubiert worden waren (Lögdberg und Shevach, 1985;), deutet auf eine kritische Rolle dieses Antigens, vielleicht als IL-1-Rezeptor, hin. Diese Funktion des Lyt-1 scheint auch bei anderen Spezies ähnlich zu sein. Vergleichbare Effekte wurden mit Antikörpern, die Lyt-1-homologe Antigene bei Ratten (MRC OX-19; Dallmann, 1984) oder Menschen (OKT-1; Thomas, 1984) auf Lymphozyten erkennen, beschrieben. Genauso wie bei Mäusen haben diese Antikörper keine Wirkung, wenn sie allein angewandt werden, sind aber in der Lage, mitogeninduzierte Stimulationen zu steigern.

Die Maus-Lyt-2- und Lyt-3-Antigene kommen an der Membranoberfläche von Thymozyten und Suppressor-/bzw. zytotoxischen Lymphozyten vor. Die immunochemischen Analysen zeigten, daß die Lyt-2- und Lyt-3-Antigene aus den drei disulfidgebundenen Polypeptid-Ketten α (MG 37000), β (MG 30000) und γ (MG 27000) zusammengesetzt sind. Die Lyt-2-Antigendeterminante wird von der α - und β -Kette bestimmt, während die Lyt-3-Determinante auf der γ -Kette auftritt (Walter et al, 1984). Die Lyt-2- und Lyt-3-Antigene werden meistens als Lyt-2 bezeichnet, da die beiden zum selben Molekül an der Zelloberfläche gehören (Durda und Gottlieb, 1978; Ledbetter et al, 1981b; Lüscher et al, 1985). Der Lyt-2-Phänotyp bei Mäuse-T-Zellen ist entscheidend für die Erkennung der Klasse I (H-2K, D oder L)-MHC-Moleküle durch T-Zellen (Swain, 1981). Auf Grund ähnlicher funktioneller Charakteristiken entspricht Lyt-2 dem CD8⁺-Phänotyp bei humanen T-Zellen (Ledbetter et al, 1981a).

Dies wurde zusätzlich durch die Kreuzhybridisierung eines CD8-entsprechenden cDNA-Klones mit der cDNA, die einen Teil des Lyt-2-Komplexes kodiert (Lüscher et al, 1985), bestätigt. Anti-Lyt-2-Antikörper können in der Anwesenheit von Komplement die zytolytische Aktivität der CTL blockieren (Nakayama et al, 1979; Sarmiento et al, 1980; Glasebrook und MacDonald, 1983).

Das Gegenstück zum humanen CD4⁺-Molekül in der Maus, das primär mit Klasse II (Ia)-MHC-Antigen-Reaktivität korreliert, ist schon lange postuliert worden (Ledbetter et al, 1981a), aber erst in letzter Zeit mittels eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen worden. Dies ist der GK 1.5-Antikörper, der das L3T4 Zelloberflächenmolekül erkennt. Der GK 1.5 blockiert Klasse II-MHC-antigenspezifische Funktionen, wie Zytolyse, Proliferation und Freisetzung von Lymphokinen. Ebenfalls wird die Produktion von IL-2 gehemmt (Dialynas et al, 1983a; Wilde et al, 1983; Swain et al, 1984)). Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, daß das L3T4-Antigen das Molekulargewicht von 52000 Dalton hat (Dialynas et al, 1983b).

cDNA-Klone, die das L3T4 kodieren, wurden isoliert. Es zeigte sich, daß die L3T4-cDNA Nucleotidsequenz homolog zu den humanen CD4-Klonen ist, und wie auch das CD8, CD4 und Lyt-2 der Ig-Gen-Superfamilie angehört. Das L3T4 wird von einem einzigen Gen kodiert, das kein Rearrangement vor der Expression braucht.

Interessanterweise wurde die für L3T4 spezifische mRNA im Gehirn gefunden, obwohl das Antigen sonst nur auf hämopoetischen Zellen nachgewiesen werden konnte (Tourvielle et al, 1986).

2.2. Thymus

Das zentrale lymphoide Organ erwachsener Tiere, in welchem sich die für die zellvermittelte Immunität verantwortlichen Lymphozyten entwickeln, ist der Thymus. Dieses Organ scheint die Hauptrolle in der Immunogenese bei jun-

gen Tieren zu spielen, aber auch während des späteren Lebens wird das ganze lymphatische System von ihr dirigiert.

2.2.1 Thymusimmigration

Der Thymus entwickelt sich bei der Maus, indem die Epithelzellen am 11. Tag fötaler Entwicklung mit lymphoiden Zellen besiedelt werden. In der weiteren Entwicklung wird der Thymus beim Fötus mit Prekursorzellen aus der Leber und dem Dottersack (Moore und Owen, 1967; Owen und Ritter, 1969) infiltriert. Bei der adulten Maus erfolgt die Besiedlung vom Knochenmark aus (Farol, 1966). Diese primitiven, unreifen Zellen werden durch den Thymus geprägt und immunologisch kompetent.

Die Besiedlung des fötalen Thymus mit extra-thymischen lymphoiden Zellen ist gut dokumentiert und experimentell geprüft. Bei Geflügelembryos ist dieser Prozeß sehr genau erforscht (Jatereau und Le Dourain, 1982). Die Stammzellen immigrieren periodisch in den fötalen Thymus. Die Zellmigration in den erwachsenen Thymus ist weniger klar. Obwohl oft angenommen wird, daß die Stammzellen kontinuierlich in den Thymus einwandern, bleiben die Beweise dafür umstritten (Micklem et al, 1968; 1975; Lepault und Weissman, 1981). Bei depletierten Thymus ist die Zahl der Zellen, welche von außerhalb des Thymus stammen, sehr gering (Boersma et al, 1981).

2.2.2 Thymus-Kinetik

Mittels (^3H)-Thymidin (Bryant, 1972; Shortman und Jackson, 1974; Fathman, 1975) oder 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BUdR) (Penit, 1986) wurde im Thymus eine starke mitotische Aktivität gefunden. 10-20% der Thymozyten proliferieren stark, und werden zu 96,8% bei Mäusen und 94% bei Ratten im Cortex gefunden. Der gesamte Zellzyklus, mit 6-7 Stunden S-Phase und sehr kurzen G_1 - und G_2 +M-Phasen dauert 9 Stunden (Bryant, 1972). Darüberhinaus beträgt die tägliche Produktion 50×10^6 Zellen, was die aktuelle thymische Emigration von $1-2 \times 10^6$ Zellen pro Tag weit übersteigt (Scollay et al, 1980; 1984). Diese Zahlen bedeuten, daß die meisten im Thymus produzierten Zellen dort absterben (McPhee et al, 1979).

2.2.3 Charakteristiken der Thymuszellen

Wie der Thymus funktioniert, was die Spezifität der T-Zellen determiniert, und wie sie sich entwickeln, ist noch eine offene Frage. Eine genaue Beschreibung der Thymozyten, ihre phänotypische und funktionelle Charakterisierung wird uns näher zu der Lösung dieses Problems bringen. Dazu wurden die Kortison-Sensitivität, die Lectinbindungs-Fähigkeit, die anatomische Lokalisierung und verschiedene physikalische Eigenschaften bestimmt. Sie werden sowohl miteinander, als auch mit monoklonalen Markerantikörpern kombiniert, um getrennte Subpopulationen zu definieren.

Mittels verschiedener Marker lassen sich medulläre und cortikale Thymozyten charakterisieren, was auch der anatomischen Unterteilung entspricht. Diese Charakterisierung stimmt zwischen diversen Spezies überein. Die meisten Zellen (80-85%) sind cortikale Thymozyten, mit einem ziemlich einheitlichen Phänotyp. Sie binden große Mengen PNA (Peanut agglutinin), sind schwach positiv oder negativ für

H-2, und das Thy-1 Antigen ist sehr stark ausgeprägt. Sie exprimieren gleichzeitig L3T4 und Lyt-2, sind aber unfähig IL-2 zu produzieren, und sie werden nach Antigen- oder Lektin-Stimulation nicht zytotoxisch.

Auf Grund ihrer Größe werden die cortikalen Zellen in zwei Subpopulationen eingeordnet; 75% kleine Zellen und 25% große Blasten. Mittels radioaktivem Thymidin oder BUdR, die in die neusynthetisierte DNA der teilenden Zellen eingebaut werden, wurde entdeckt, daß nur die größeren blastoiden Zellen aktiv proliferieren. Die meisten proliferierenden Zellen sterben in situ (McPhee et al, 1979; Scollay et al, 1980). Im Cortex befinden sich auch 3-5% Thymozyten, die sowohl L3T4- als auch Lyt-2-negativ sind. Sie befinden sich in der proliferativen Phase des Zellzyklus und repräsentieren wahrscheinlich die thymischen Stamm- oder Präkursor-Zellen. Die restlichen 15% der Thymozyten sind in der Medulla und vertreten per definitionem die klassischen "reifen" Thymozyten. Die geringere Zelldichte und das größere Volumen dieser Zellen ausgenommen, sind sie den T-Zellen der Peripherie sehr ähnlich.

Die medullären Zellen sind mittelgroß, PNA⁻, sehr stark H-2 aber schwach Thy-1-positiv. Sie exprimieren entweder L3T4 oder Lyt-2, aber nie beide Antigene gleichzeitig. Zwei Drittel der medullären Zellen sind L3T4⁺ Lyt-2⁻ und können IL-2 produzieren, während ein Drittel der L3T4⁻ Lyt-2⁺ zytolytisch werden kann. Diese Zellen befinden sich wie die unstimulierten T-Zellen der Peripherie in der G₀/G₁ Phase.

2.2.4 T-Zell-Antigen-Rezeptor und MHC-Antigene

Ein möglicher Marker der T-Zell-Entwicklung kann der T-Zell-Antigen-Rezeptor sein. Ein genetisches Rearrangement ist nötig, um einen kompetenten T-Zell-Antigen-Rezeptor zu formieren. Wenn dies nicht eintritt, wird der Rezeptor nicht transkribiert und translatiert, was zum Tod der Zellen führen könnte. Das würde auch die funktionellen

Tests erklären, bei denen nur die phänotypisch reifen Zellen auf T-Zell-Antigen-Rezeptor aktivierende Signale reagieren können. Die funktionellen Tests zeigen, daß nur die medullären Thymozyten einen Rezeptor haben, der das Antigen und eigene MHC-Antigene erkennt.

Mittels monoklonaler Antikörper gegen MHC-Antigene wurde nachgewiesen, daß die Fähigkeit, Eigenes vom Fremden zu unterscheiden, von den Thymozyten auf den Gerüstzellen gelernt wird. Elektronenmikroskopische und andere Untersuchungen zeigen, daß die meisten MHC⁺-Zellen im Thymus retikuloepitheliale Zellen sind (Hoffmann-Fezer et al, 1978; van Ewijk et al, 1980). In der Medulla sind auch die Lymphozyten MHC⁺, während die MHC Antigene bei den kortikalen Lymphozyten nicht nachweisbar sind. Es ist anzunehmen, daß die retikuloepithelialen Zellen in dem H-2-Restriktionsprozeß während der T-Zell-Reifung eine wichtige Rolle haben. Um aktiviert werden zu können, müssen die T-Lymphozyten mittels T-Zell-Rezeptor die zellpräsentierten Antigene vereint mit MHC-Genprodukten binden.

Zusätzlich helfen die nichtpolymorphen T-Zelloberflächenmoleküle (CD4/L3T4 oder CD8/Lyt-2) bei der Formierung des T-Zell-Rezeptor-Antigen-MHC-Komplexes. Diese Moleküle stabilisieren die Interaktion zwischen T-Lymphozyten und ihren Zielzellen (Malissen, 1986).

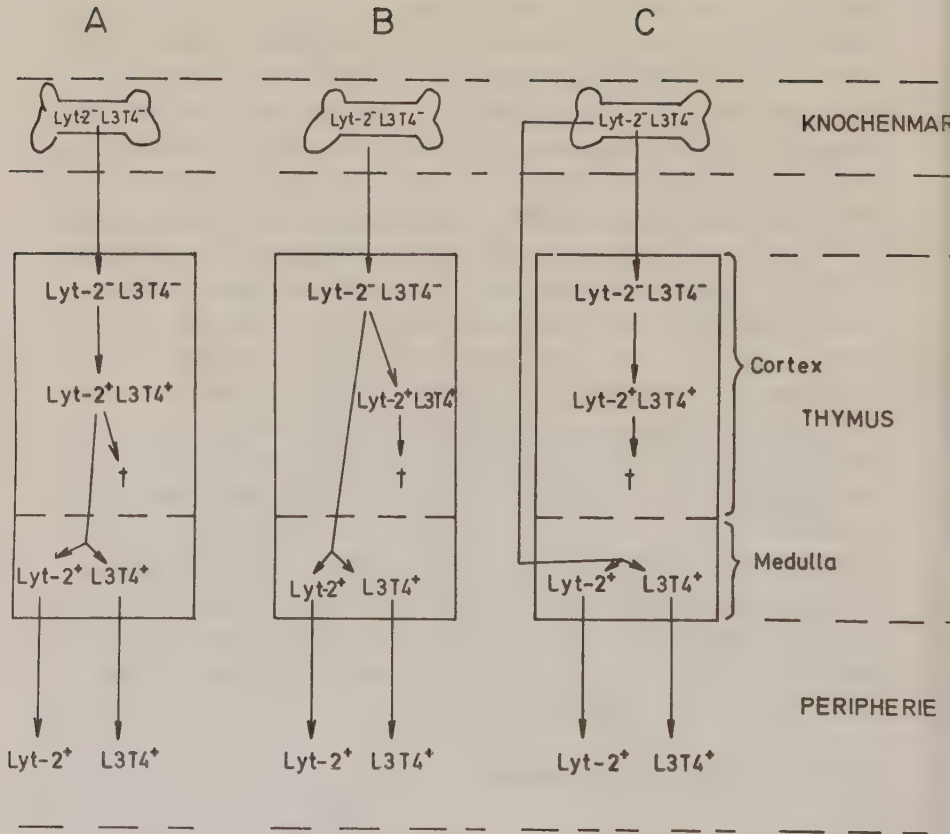
2.2.5 T-Zell-Differenzierung

Anhand der Zellkinetik, Morphologie und Zelloberflächenmarker der Thymozyten wurden zwei Theorien aufgestellt.

Nach der ersten Einwegtheorie (Abb.1A) sind die verschiedenen Zellsubpopulationen im Thymus nur Differenzierungsstufen einer Zellreihe, die sich von den Stammzellen zu reifen T-Lymphozyten entwickelt. Die Lyt-2- und L3T4-negativen Stammzellen im Cortex repräsentieren den unreifen Phänotyp. Sie sind sehr stark Thy-1-positiv, exprimieren gleichzeitig L3T4 und Lyt-2 und sind H-2-negativ. Für den größten Teil (96%) dieser Zellen ist mit dieser

Abbildung 1

T-Zell-Entwicklung



A Einweg-Theorie

B Zweiweg-Theorie, nach der sich beide Entwicklungsreihen erst im Thymus aufspalten

C Zweiweg-Theorie, nach der sich beide Entwicklungsreihen schon vor dem Thymuseintritt aufspalten

Entwicklung das Endstadium erreicht und sie sterben dort (McPhee et al, 1979; Scollay et al, 1980). Dies könnte ein "eingebauter Prozeß" der Thymus-Funktion sein und weist auf den negativen Selektionsprozeß hin. Damit werden die "ungewünschten" oder "selbst-reaktiven" Zellen eliminiert, bevor sie in die Peripherie gelangen (Burnet, 1968; Shortman et al, 1972). Wenige dieser $L3T4^+$ $Lyt\ 2^+$ -Zellen wandern zur Medulla und entwickeln sich zu kleinen Zellen mit reifen Oberflächenmarkern (Thy-1 schwach, H-2⁺ und entweder $L3T4^+$ oder $Lyt-2^+$). Diese Zellen emigrieren dann in die Peripherie (Lymphknoten, Milz u.a.).

Für dieses Modell spricht die hohe mitotische Aktivität der kortikalen Thymozyten und ihre funktionelle Inaktivität. Es wurde auch mittels BUdR gezeigt, daß die teilenden Zellen tatsächlich vom Cortex zur Medulla wandern (Penitt, 1986).

Dieses Modell erklärt aber nicht die Ergebnisse bei der Thymusrepopulierung der Vögel, bei welchen proliferierende Zellen gleichzeitig in Cortex und Medulla gefunden wurden (Jaterau und Le Douarin, 1982).

Die zweite Theorie setzt zwei unabhängige Zellreihen, die sich aus der Stammzelle entwickeln, voraus. Eine Zellreihe differenziert sich in die doppelpositive ($L3T4^+$ $Lyt-2^+$) funktionell blockierte Endzelle, während die andere zu funktionellen peripheren T-Zellen führt. Abbildung 1 (B und C) zeigt zwei Variationen dieses Modells. Entweder entsteht die Verzweigung in zwei verschiedenen Differenzierungsreihen beim Eintritt der Stammzelle in den Cortex (Abb. 1B), oder es wandern vorher getrennte Stammzellen unabhängig in Cortex und Medulla ein (Abb. 1C). Für die unabhängige Entwicklung der doppelpositiven ($L3T4^+$ $Lyt-2^+$) und einmalpositiven ($L3T4^+$ oder $Lyt-2^+$) Zellen spricht die gleichzeitige Zellproliferation in Cortex und Medulla bei der Thymusrepopulierung (Jaterau und Le Douarin, 1982). Auch das Vorhandensein der kleinen Cortexzellpopulation mit dem für reife Lymphozyten charakteristischen MEL-14-Antigen, das für die Rezirkulierung wichtig ist, unterstützt diese Theorie.

2.3 Zellexport

Um die emigrierenden Zellen zu verfolgen und zu quantifizieren, werden die Zellen in Thymus mit FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) in situ markiert. Dabei zeigt sich, daß nur ein kleiner Teil der Thymozyten pro Tag den Thymus verläßt. Das sind 8×10^7 Zellen/Tag/kg Gewicht oder 1% aller Thymozyten jeden Tag. Diese Zahl ist bei älteren Tieren noch kleiner, bei 6 Monate alten Mäusen gibt es nur noch 0,1% thymusemigrierende Zellen (Scollay et al, 1980). Diese Zellen besiedeln Lymphknoten, Milz und Payer's Plaques.

Obwohl die Zellen, die den Thymus verlassen, funktionell reif sind und einen reifen Lyt-2- oder L3T4-definierten Phänotyp haben, unterscheiden sie sich jedoch in Größe, Zelldichte und einem Membranantigen, das mit dem B2A2 Antikörper definiert ist, von den T-Zellen in der Peripherie (Scollay et al, 1984). Der B2A2 Antikörper ist in Anwesenheit von Komplement für die jüngsten Thymusemigranten, aber nicht für die reifen peripheren T Lymphozyten zytotoxisch. Außerdem sind die jüngsten Thymusemigranten im Gegensatz zu peripheren T Lymphozyten auch kortisonempfindlich. Innerhalb der ersten Zeit, nachdem diese Zellen den Thymus verlassen haben, unterliegen sie noch kleineren Veränderungen, um schließlich identisch mit den reifen peripheren T-Lymphozyten zu werden.

3. ABKÜRZUNGEN

AEC	3-Amino-9-Äthylcarbazol
ATX	Adult thymektomierte, bestrahlte und rekonstitutierte Mäuse
BCIG	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- -Galaktopyranoside
BNHS	Biotinyl-N-Hydroxysuccinimid
BUDR	5-Bromo-2-Deoxiuridin
Ci	Curie
Con-A	Concanavalin A
cpm	counts per minute
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein Isithiocyanat
GvHR	Graft-versus-Host-Reaktion
^3H -NSP	N-Succinimidyl (2,3- ^3H)Propionat
^3H -TdR	^3H -Deoxithyminidin
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IL-2	Interleukin-2
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex
PLL	Poly-L-Lysin
POX	Peroxidase
RIA	Radioimmunoassay

B MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Versuchstiere

Inzucht-Stämme AKR/J, AKR/Cu, CBA/J und C57BL/6-Mäuse und Lewis-Ratten wurden von Pedigree-Linien in der GSF unterhalten. Tiere (6-8 Wochen alt) beiderlei Geschlechts wurden sowohl für in vivo Versuche, als auch als Spender für Thymozyten, Lymphknoten- und Knochenmarkszellen verwendet.

Die einzelnen Stämme unterscheiden sich u. a. durch die Zelloberflächen-exprimierten Antigene. Die für Transplantationsversuche eingesetzten Mäuse AKR/J und AKR/Cu unterscheiden sich nur in der Expression der Thy-1-Alloantigene, wobei AKR/J Thy-1.1 und AKR/Cu Thy-1.2 besitzen.

1.2 Zellen

Thymozyten, Milz-, Lymphknoten- und Knochenmarkszellen wurden präpariert, indem die Organe durch ein Sieb gepreßt, zweimal gewaschen und in proteinfreiem Medium resuspendiert worden waren.

Für die Objektträger-Methode wurden die Organe mit der Schere zerkleinert und die Zellsuspension in ein 15 ml Glasröhrchen überführt. Nachdem die verbliebenen Gewebestücke sich innerhalb weniger Minuten am Boden abgesetzt hatten, wurde die Zellsuspension in ein neues Röhrchen transferiert und zweimal gewaschen. Dieses Verfahren wurde auf Eis durchgeführt.

1.3. Antikörper

1.3.1 Monoklonale Antikörper

Maus-anti-Thy-1.1 (Mason und Williams, 1980) wurde von den Hybridoma-Zellen MRC OX7 produziert, die ein Geschenk von S.V. Hunt und A.F. Williams waren.

Ratte-Anti-Maus Lyt-1 und Lyt-2 (Klon 53-7.3 und 53-6.7, Ledbetter et al, 1979), L3T4 (GK 1.5, Dialynas et al, 1983) und Thy-1.2 (Klon 30-H12, Ledbetter et al, 1979) wurden von Becton und Dickinson (Heidelberg) bezogen.

TABELLE 1

Wichtigste Eigenschaften der verwendeten Antikörper

Antikörper	Species	Spezifität	Antikörper- subklasse	Referenz
MRC OX7 ^a	Maus	Thy-1.1	IgG1	Mason und Williams (1980)
Anti-Thy-1.2 ^a 30-H12	Ratte	Thy-1.2	IgG2b	Ledbetter et al. (1979)
Anti-Lyt-1 ^a 53.7.3	-"-	Lyt-1	IgG2a	-"-
Anti-Lyt-2 ^a 53-6.7	-"-	Lyt-2	IgG2a	-"-
Anti-L3T4 ^a GK1.5	-"-	L3T4	IgG2b	Dialynas et al. (1983)
Anti-Maus-Ig ^b	Kaninchen	Ig	IgG	Dianova
Anti-Maus-Ig ^b	Ratte	Ig	IgG	-"-
Anti-Ratte-Ig ^b	Kaninchen	Ig	IgG	Dako
Anti-Kaninchen ^b	Schwein	Ig	IgG	-"-
Anti-Ratte-Ig ^b	Maus	Ig	IgG	-"-
Anti-Ratte-Ig ^b	Hammel	Ig	IgG	Amersham

^a Monoklonale Antikörper

^b Polyklonale Antikörper

1.3.2 Polyklonale Antikörper

Peroxidase-markierte Ratte-Anti-Maus-Immunglobuline (Dako, Hamburg) wurden für den Nachweis von Maus-B-Zellen verwendet. Für die Peroxidase-anti-peroxidase (PAP) Immunzytochemie wurden Kaninchen-Anti-Ratte-Ig (1:160) bzw. Kaninchen-Anti-Maus Ig (1:60) und Schwein-Anti-Kaninchen-Ig 1:70 (Dako, Hamburg) genommen.

Die Anti-Peroxidase wurde im Kaninchen erzeugt und mit der Peroxidase des PAP-Komplexes hergestellt.

In Tabelle 1 sind alle Antikörper, die für die hier beschriebenen Experimente verwendet wurden, zusammengefaßt.

1.4. Medien und Lösungen

- MEM - Minimum Essential Medium (MEM, Eagle, 10 x konzentriert, Gibco) wird mit destilliertem Wasser verdünnt und mit 1M-Hepes pH 8, auf pH 7,4 gepuffert.
- PBS - Phosphat gepufferte Salzlösung, pH 7,4/0,15 M
 - NaCl 0,145M
 - NaH₂PO₄ 0,001M
 - Na₂HPO₄ 0,004M
- MAG - (MEM, Albumin, Gelatine)
MEM wird mit 0,2%iger Bovine Serum Albumin (BSA), 0,2%iger Gelatine und 0,1%iger NaN₃ hergestellt und bei 4°C aufbewahrt.
- Michaelispuffer wird unmittelbar vor Gebrauch aus 0,1M Veronalnatrium und 0,1 NHCl hergestellt und auf pH 7,35 eingestellt.
- Polysiloxan
 - Propanol 84 ml
 - Konz. H₂SO₄ 1 ml
 - Dimethylpolysiloxan 15 ml

-~~β~~-Galaktosidasesubstratpuffer

PBS inklusiv 1mM MgCl ₂	7,0 ml
Kaliumferricyanide	0,5 ml
Kaliumferrocyanide	0,5 ml

2. Methoden

2.1. Bestrahlung

Als immunsuppressive Vorbereitung für das Einwachsen der Spenderzellen wurden die Empfängerermäuse 24 h vor der Zellübertragung letal (8 Gy) mit Gammastrahlen aus einer ¹³⁷Cs Quelle (Gammacell, HWM-D-2000, 131 rad/min) bestrahlt.

Die Mäuse, die nicht transplantiert wurden, starben innerhalb von 12 Tagen.

Den auf diese Weise bestrahlten Tieren, wurde eine Mischung von 10^7 Knochenmark- und 2×10^7 Lymphknoten-zellen in 0,25 ml Medium in die Schwanzvene injiziert.

2.2. Absorption der Antikörper

Um verschiedene Antikörper gleichzeitig nachzuweisen ist es nötig, die Antikörper so zu absorbieren, daß eine Kreuzreaktion des Nachweissystems mit dem anderen Antikörper oder Maus B-Zellen verhindert wird. Weil Kaninchen-anti-Ratten-Ig-Antikörper zum Teil noch mit Mäuse-Ig oder B-Zellen reagieren, wurden sie auf eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals) mit kovalent gebundenem Mäuse-Ig, aufgetragen. Damit wurde jede verbliebene unspezifische Reaktivität mit Maus-Ig absorbiert.

2.3. Antikörper-Koppelung

2.3.1 Tritium-Koppelung

Anti-Lyt-1 und OX7 wurden mit Tritium nach der Methode von Kummer et al (1981) gekoppelt. Das zu markierende Protein wurde auf 2 mg/ml eingestellt und gegen 1000 ml

Volumina 0,1M Na-Borat/HCl-Puffer mit Zusatz von 0,5 M NaCl (pH 8,5) dialysiert. Zur Markierung wurde N-succinimidyl (2,3-³H)Propionat (Amersham Buchler) verwendet.

Unmittelbar vor der Koppelung wurden ³H-NSP abgedampft, indem ein sanfter Stickstoffstrom über die Lösungsoberfläche geleitet wurde. Gleich nach der vollkommenen Trocknung des ³H-NSP wurde das dialysierte Protein zugegeben (routinemäßig 0,2 mg Protein pro 1 mCi ³H-NSP) und 30 min auf Eis geschüttelt. Das gekoppelte Protein wurde von dem ungekoppelten getrennt, indem die Mischung auf eine Bio-Gel-P6-DG-Säule (20x1 cm; Pharmacia Fine Chemicals) aufgetragen wurde. Die Flußrate wurde auf 15 cm/h gestellt und Fraktionen von 0,6 ml gesammelt. Von jeder Fraktion wurden 10 µl entnommen, mit 5 ml Szintillationslösung gemischt und die Radioaktivität gemessen. Die Fraktionen mit dem ³H-gekoppelten Protein wurden gesammelt. Spezifische Aktivität des tritierten Antikörper war 800 Ci/mmol (15 TBq/mmol).

2.3.2 Biotin-Koppelung

Mittels Biotinyl-N-hydroxysuccinimid (BNHS; Sigma) wurde Biotin an den Antikörper kovalent nach Heitzman und Richards (1974) gebunden. BNHS wurde in N,N-dimethylformanid aufgelöst (1-16 mg/ml) und mit dem Antikörper (1-5 mg/ml, pH 7,4) im Verhältnis 1:10 gemischt. Diese Mischung wurde 1,5 Stunden bei ständigem Schütteln inkubiert und dann über Nacht gegen PBS bei 4°C dialysiert.

2.4 RIA (Radioimmunoassay)

Zur Austestung des gekoppelten Antikörpers wurde der Radioimmunoassay eingesetzt. Die Verdünnungsreihe der auszu-testenden Antikörper wurde mit jeweils 10⁶ Zielzellen 15 min inkubiert. Nach dieser Inkubation folgten drei Waschschritte, um den ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellsuspension wurde auf Glasfaser-Filter (Schleicher &

Schüll) transferiert, getrocknet und in Szintillationslösung (Rotiszint 100, Roth) überführt. Die zellgebundene Radioaktivität wurde im Flüssig-Szintillationsspektrometer gemessen.

2.5 Immunfluoreszenz

Die Zellen werden bei 4°C mit dem Antikörper 20 min inkubiert, danach dreimal in MEM gewaschen und anschließend im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.6. Multispot-Adhäsion-Objektträger-Methode

2.6.1 Herstellung der Objektträger mit PLL-beschichteten Bezirken

Die Objektträger wurden mindestens 2 Tage in einer Mischung 80:20 Alkohol-Äther eingelegt, anschließend sorgfältig geputzt und getrocknet. Um auf diesen Objektträger Bezirke für Zellanhaftung herzustellen und die Reaktionsfelder zu begrenzen, wurden zwei Verfahren durchgeführt:

a) Adhäsion der Plastikfolie

Eine wasserabstoßende Plastikfolie mit 10-12 Löchern wurde auf den Objektträger geklebt. Da die käuflich verfügbare Folie nicht genug wasserabstoßend ist, wurde eine selbst hergestellte hochwasserabstoßende Folie benutzt. Eine Mischung aus 3 Teilen Silicon-Kautschuk RTUME 625 a und einem Teil RTUME 625 b (Wacker, München) wurde zubereitet, in dünne Schichten auf Glasscheiben aufgetragen, die dann mindestens 2 h polymerisierten. Nachdem dieses Blatt in 24 x 60 mm Stücke geschnitten und auf Objektträger aufgelegt wurde, wurden 10-12 (Ø 5 mm) Löcher in regelmäßigen Abständen in 2 Reihen durchbohrt.

Dieses Polymer hat vor allen anderen Plastikfolien den Vorteil, daß es sehr einfach durch Adhäsion auf dem Glas klebt, und daß es extrem wasserabstoßend ist.

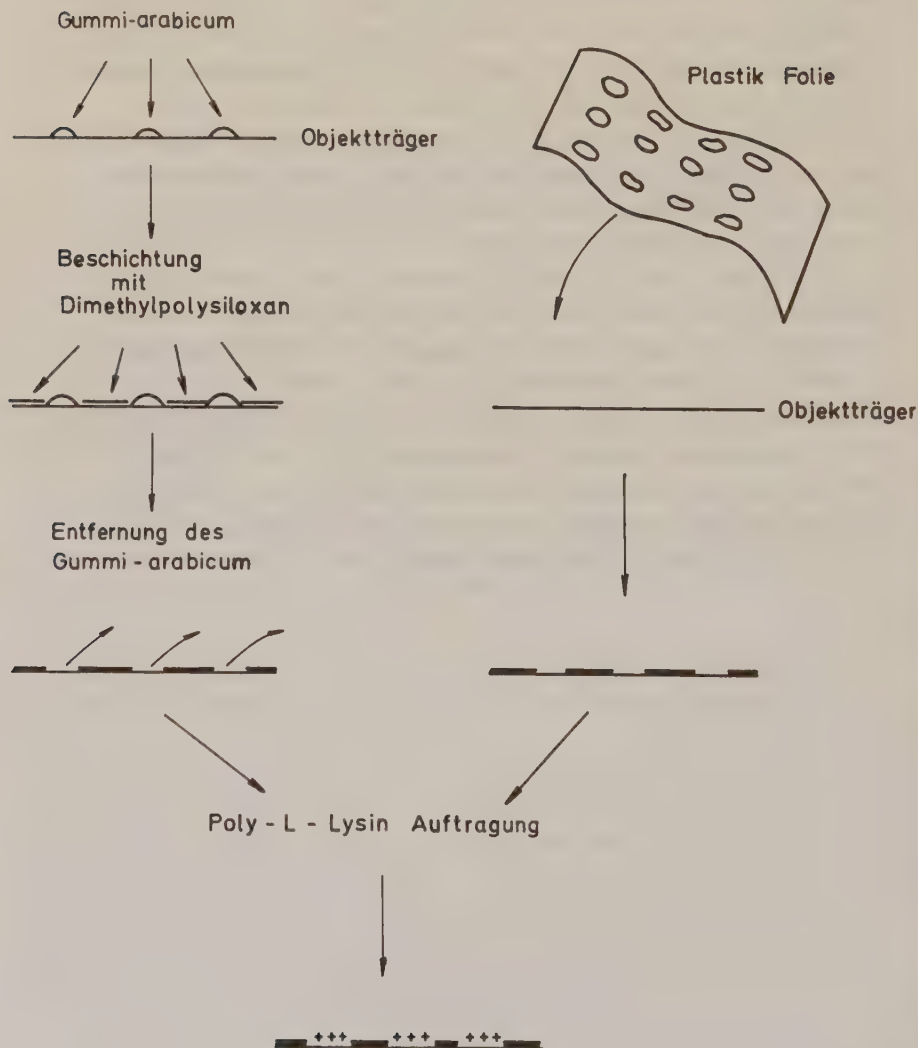
b) Beschichtung der Objektträger mit Dimethylpolysiloxan

Auf gesäuberte, fettfreie Objektträger wurde eine Lösung von Gummi arabicum (Merck, Darmstadt) und Saccharose (jeweils 100 g/l) aufgetropft. Die Tropfen (0,3 mm) wurden in 2 oder 3 Reihen mit 10 mm Abstand angeordnet (Abb. 2). Nach dem Eintrocknen der Gummi arabicum-Saccharose-Tropfen wurde das wasserabstoßende Dimethylpolysiloxan (15% DMPS-2x in Propanol mit 1,9% rauchender Schwefelsäure) in einer sehr dünnen Schicht um die mit Gummi arabicum geschützten Bezirke aufgetragen, getrocknet und dann der Überschuss vorsichtig entfernt.

Die Objektträger wurden 5 Stunden in Aqua dest. gewaschen, um die Gummi arabicum Tropfen aufzulösen. Auf den Bezirken, die mit Gummi arabicum reserviert worden waren, blieben nach dem Auswaschen des Gummi arabicums Wassertropfen, die sich durch die Oberflächenspannung scharf von der hydrophoben Umgebung abgrenzten. Die Wassertropfen wurden durch jeweils 20 µl einer 0,01%igen wässrigen Lösung von Poly-L-Lysin (PLL, MG 90000, Sigma) (Mazia et al, 1975; Bross, 1978) ersetzt, 30' bei 4°C inkubiert und anschließend luftdicht bei -20°C aufbewahrt.

Abbildung 2

Multispot-Adhäsion-Objektträger Herstellung



Links: mit Gummi-arabicum und Dimethylpolysiloxan

Rechts: mit Auftragung der wasserabstoßenden Plastikfolie

2.6.2 Zellhaftung und Fixierung

Unmittelbar vor der Verwendung müssen die Reaktionsfelder mit PBS (pH 7,4) sorgfältig abgespült werden, um das nicht-adsorbierte PLL zu entfernen. Da die Objektträger von nun an auf keinen Fall austrocknen dürfen, wurden sie in einer feuchten Kammer (einer Petrischale, Ø 12 cm, mit nassem Papier) aufbewahrt. Die aufzutragenden Zellen werden nach dem letzten Waschen in proteinfreiem Medium (MEM, pH 7,4) resuspendiert und auf 3×10^6 /ml Zellkonzentration eingestellt. Die entscheidende Voraussetzung für eine schöne Zellmorphologie ist, die Zellen vital und ungeschädigt zu erhalten. Deshalb werden die Zellen immer frisch präpariert, und alle Schritte werden auf Eis durchgeführt.

Gleich nach dem Absaugen des Puffers von den Reaktionsfeldern werden die Zellen aufgetragen. Man läßt sie 30' bei 4°C und danach 10' bei Zimmertemperatur sedimentieren. Die Zelldichte in den PLL-Bezirken wird im Invertmikroskop kontrolliert. Für die Zellfixierung wurde Glutaraldehyd ("grade 1", Sigma) jedesmal frisch in PBS, pH 7,4 auf eine Endkonzentration von 0,05% verdünnt. Die Objektträger kann man in einem Becherglas mit der Fixierlösung eintauchen oder die Lösung tropfenweise auf jedes Feld auftragen. Die Fixierung zur Konservierung der Zelloberflächenantigene dauert 10 min, welches die Reaktivität des Antigens nur unwesentlich beeinflusst. Mittels sorgfältigem Eintauchen in ein Becherglas mit PBS pH 7,4 wird die Fixierung unterbrochen und beendet.

Nachdem der Puffer auf den Reaktionsfeldern durch einen Tropfen MAG ersetzt wird, können die Zellen weiter verarbeitet werden oder in der feuchten Kammer bei 4°C mehrere Tage lagern.

2.6.3 Inkubation mit Antikörper

Monoklonale (Maus- und Ratten-) Antikörper und polyklonale (Kaninchen- und Schwein-)Antiseren (angegeben in Tabelle 2) werden in MAG verdünnt und auf die Zellen aufgetragen. Für jeden Antikörper muß die optimale Verdünnung

TABELLE 2

Verdünnung der Antikörper:

Antikörper	Endverdünnung	Hersteller
MRC OX7	1:200	Mason und Williams (1980)
anti-Thy-1.2	1:200	Becton und Dickinson
anti-Lyt-1	1:2000	-"-
anti-Lyt-2	1:1500	-"-
anti-L3T4	1:400	-"-
Kaninchen-anti-Maus Ig	1:60	Dianova
Ratte-anti-Maus Ig	1:40	-"-
Kaninchen-anti-Ratte Ig	1:160	Dako
Schwein-anti-Kaninchen Ig	1:70	-"-
PAP-Komplex	1:100	Hoffmann-Fezer (Eigenproduktion)
Maus-anti-Ratte Ig	1:150	Dako
Hammel-anti-Ratte Ig	1:30	Amersham

auf für diese Antikörper positiven und negativen Zellen in Verdünnungsreihen ausgetestet werden. Bis auf den PAP-Komplex, der frisch anzusetzen ist, können alle untersuchten Antikörper verdünnt aufbewahrt werden. Nachdem die Antikörper auf die Zellen aufgetragen wurden und 30' inkubierten, folgte anschließend die 20' Inkubation mit dem Peroxidasesubstrat (3-Amino-9-Äthylcarbazol, AEC; Sigma mit 0,005% Wasserstoffperoxid, Merck) nach Schaefer und Fischer (1968).

2.6.4 Doppelmarkierung mit zwei immunzytochemischen Methoden

Für die Doppelmarkierung mit zwei immunzytochemischen Methoden (Hoffmann-Fezer, 1986; Thierfelder et al, im Druck) werden anstatt ^3H -markiertem, β -Galaktosidase-markierter Antikörper verwendet. Die Zellfixierung und Inkubationsverfahren sind wie in 2.5.3.. Anschließend folgt nach der Inkubation mit dem Peroxidasesubstrat (AEC) 1^{h} Inkubation mit β -Galaktosidasesubstrat (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -Galaktopyranoside, BCIG) nach Lojda et al (1976).

2.7. Autoradiographie

2.7.1 Auflegen des Films auf die Objektträger

Nach der Peroxidasereaktion werden die Objektträger in PBS gewaschen, auf der freien Rückseite und um die Bezirke mit Zellen mit 1%iger Gelatinelösung bestrichen. Das ist besonders bei Polysiloxan-hergestellten Objektträgern wichtig, weil es eine bessere Filmanheftung ermöglicht.

Nach dem Eintrocknen der Gelatine wird nach der von Schmid modifizierten Methode (1965) der Kodak AR10 Strippingfilm aufgelegt. Alle Arbeitsgänge mit dem Strippingfilm müssen in einer Dunkelkammer bei Schutzlicht ausgeführt werden. Da bei zu trockener Luft elektrische Entladungen vorkommen, ist eine Luftfeuchtigkeit von 60% zu empfehlen. Die Filmplatte wird in 70%igem Äthanol 6 min eingelegt, und da sie 12 x 16 cm groß ist, muß man den Film in die gewünschten Stücke zerteilen.

Gleich danach wird die Filmplatte in 100%iges Äthanol zur weiteren Entwässerung übertragen. Die Filmstücke lassen sich jetzt ohne Funkenbildung und ohne sich zu rollen abziehen. Mit der Schicht nach unten werden sie auf die Oberfläche eines Wasserbades gelegt. 1-2 min läßt man sie quellen und ausdehnen. Danach wird jedes Filmstück mit dem Objektträger "unterfahren" und aus dem Wasser herausgenommen, wobei es fest an dem Objektträger haftet.

2.7.2 Exponieren, Entwickeln, Fixieren und Färben der Filme

Die filmüberzogenen Objektträger werden 30' bei völliger Dunkelheit getrocknet, und dann in fest geschlossenen Kästen auf -20°C für unterschiedlich lange Zeit exponiert. Nach der Exposition werden die Autoradiogramme in Kodak D-19-Entwickler 6 min bei Zimmertemperatur entwickelt und nach kurzem Zwischenbad 30 min in Kodak Unifix fixiert. Die Objektträger werden 1 h in fließendem Wasser gewässert und ohne zu trocknen 15 min in Meyer's saurem Hämalaun gefärbt. Es folgt 1 Stunde Bläuen im Leitungswasser, und

anschließend werden die Objektträger an der Luft getrocknet. Filmteile, die den Objektträger überlappen und sich an dessen Rückseite anlegen werden abgekratzt.

2.7.3. Auswertung

a) Visuelle Zählverfahren (Silberkornzählung)

Die Auswertungen wurden alle visuell im Zeiss-Mikroskop bei 1200facher Vergrößerung durchgeführt.

Der Untergrund durch unspezifische Immunglobulinbindung an Glas, verstärkt durch die PLL-Beschichtung wurde mit Gelatine und Albumin, die in MAG enthalten sind, verhindert. Genauso wurde die Untergrundreaktion an Zellen durch Präinkubation oder Zusatz von Serum vermieden.

Der Untergrund durch den Einfluß der Umgebungsstrahlung, Lichteinwirkung, elektrostatische Entladung, mechanische Druckwirkung, Entwicklungsprozeß oder hohe Temperaturen wurde ganz allgemein von den außerhalb der Zellen liegenden Silberkörnern repräsentiert. Es wurde aber in keinem Versuch größer als 3 Silberkörner pro $100\text{ }\mu\text{m}^2$. Das heißt, daß jede Zelle die auf dem übergelegten Film mehr als 5 Silberkörner hat, als positiv gezählt werden kann.

b) Photometrie

Die Silberkörner über den Zellen wurden mittels der Auflicht-Hellfeld-Photometrie mit einem Mikroskop-Photometer mit variabler Meßblende (MPV2, Fa. Leitz, Wetzlar) gemessen. Mit dem Photometer wird die Silberkornzahl photoelektrisch registriert, d.h. jene Lichtmenge erfaßt, die von den einzelnen Silberkörnern reflektiert wird (Dörmer et al, 1966).

Der Durchmesser des Meßfeldes beträgt etwa das Zweifache des Zelldurchmessers (Thiel, 1975). Die zu messende Zelle wird in das Meßfeld gebracht und fokussiert, das Durchlicht ausgeblendet, und als Äquivalent für die Silberkornzahl wird die relative Menge des remittierten Lichtes photoelektrisch registriert. Diese Registrierung des remittierten Lichts muß konstant gehalten werden, indem das Photometer in Abständen von 20 min mittels eines Eichobjektivs als Reflexionsstandard und einer Eichblende geeicht wird.

Dabei wird ein konstanter Lichteinfall eine konstante Lichtmenge reflektieren. Es wurden nur isoliert liegende Zellen gemessen, um Streulicht-Effekte von benachbarten Zellen auszuschließen.

Durch Messungen von unmarkierten Zellen auf jedem Präparat wurden Untergrundwerte bestimmt. Mittels einer dazugeschalteten Rechenmaschine wurden die Meßwerte ausgedruckt und über elektronische Datenverarbeitung in Histogrammen dargestellt.

2.8 ^3H -Thymidin Einbau

Die Zellen werden in Medium aufgenommen und auf $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Davon werden $200/\mu\text{l}$ ($=1 \times 10^6$ Zellen) mit $20/\mu\text{l}$ FCS und $10/\mu\text{l}$ ^3H -Thymidin ($1/\mu\text{Ci}/\text{ml}$) gemischt und bei 37°C , $5-7\%$ CO_2 für 6 Stunden inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Zellen dreimal in MEM gewaschen, auf $3 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt und auf Multispot-Adhäsion-Objektträger aufgetragen.

Die Zellen werden fixiert, mit peroxidasemarkiertem Antikörper inkubiert und anschließend wird die Reaktion im Peroxidasesubstrat (AEC) entwickelt (siehe Kapitel B, 2.6.2 und 2.6.3.). Danach wird das Autoradiographie-Verfahren durchgeführt (siehe Kapitel B, 2.7).

C ERGEBNISSE

1. Simultaner immunzytochemischer und immunautoradiographischer Nachweis von Leukozytenmarkern

1.1 Autoradiographie

1.1.1 ^3H -Koppelung der Antikörper

Mittels N-succinimidyl (2,3- ^3H)propionat wurden die Antikörper gekoppelt, was zu einer spezifischen Aktivität führt, die derjenigen nach Jodierung vergleichbar ist. Da ^3H -NSP geladene Gruppen ins Protein bringt, wird die Gesamtladung der Moleküle erhöht. Um daraus resultierende Neigung zur Aggregation des Proteins zu vermindern, wird eine relativ hohe Salzkonzentration (0,5M NaCl) dem Koppelungspuffer beigesetzt. Diese hohe Salzkonzentration hat einen großen Protektionseffekt, ohne daß die Koppelungseffizienz negativ beeinflusst wird (Kummer, 1986).

Da die monoklonalen Antikörper im Gegensatz zu polyklonalen Antisera wegen ihrer sehr homogenen Zusammensetzung hoch individuelle Charakteristiken haben, ist es möglich, daß manche Antikörper auf pH oder Salzkonzentrationsänderung sehr empfindlich reagieren. Bei der Koppelung könnten solche Antikörper denaturiert werden. Deshalb muß die spezifische Aktivität der Antikörper nach jeder Koppelung getestet werden. Um eine hohe Sensitivität zu erzeugen, erfolgte eine gegenüber der bisherigen Standardmarkierung (Kummer, 1981; Spezifische Aktivität 400 Ci/mmol) höhere Koppelung des Antikörpers. Damit wurde die im direkten Test fehlende Verstärkerfunktion des "Sandwich-Antikörpers" kompensiert.

Es wurden anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 und anti-Thy-1.1 in 1:7,5 molarem Verhältnis mit ^3H -NSP gekoppelt, was routinemäßig 4 bis 5 Moleküle (2,3- ^3H) Propionsäure-Gruppen pro Immunglobulin-Molekül bindet. Daraus resultierte eine spezifische Aktivität des ^3H -gekoppelten

Proteins um 800 Ci/mmol (15 TBq/mmol). Nach der Trennung der formierten Konjugate von nicht gebundenen Radionukli- den über eine Bio-Gel P-6DG-Säule wurden 0,6 ml Fraktio- nen gesammelt und die Radioaktivität gemessen. Abbildung 3 zeigt die 2 Gipfel, die danach erschienen. Der erste ist der Tritiummarkierte Thy-1.1, und der zweite ist die nicht gebundene ^3H -NSP. Die Proteinausbeutung beträgt 80-90%.

1.1.2 Bestimmung des Sättigungsbereiches

Um die biologische Funktion oder Antigenbindungskapazi- tät des Antikörpers zu testen, wurde zuerst ein direkter RIA (Radioimmunoassay) mit AKR-Lymphknoten und Thymuszellen durchgeführt. Dazu wurden ansteigende Konzentrationen des Konjugats mit den Zielzellen inkubiert und die zellge- bundene Radiokativität bestimmt. Auch wenn statt 5 Molekü- len 10 Moleküle radioaktive Propionsäure pro Antikörper gebunden werden, indem 120 μg Antikörper mit 1,2 mCi ^3H -NSP gekoppelt wird, verdoppelt sich das positive Meß- signal ohne eine Erhöhung des Hintergrundsignales. Trotz der hohen Markierung zeigten die Antikörper volle Affini- tät zum korrespondierendem Antigen.

1.1.3 Expositionszeit

Der durch RIA bestimmte Sättigungsbereich des Antikör- pers wurde auf die Autoradiogramme nach Zellzahl und Volu- men umgerechnet. Da für die Autoradiographie andere Bedin- gungen und Faktoren bestehen, sind die RIA-Werte nicht direkt übertragbar. Darüberhinaus wurden für jeden ^3H - gekoppelten Antikörper (anti-Thy-1.1, anti-Lyt-1 und an- ti-Lyt-2) die Bedingungen für eine optimale Zellmarkierung geschaffen. Drei Verdünnungen, die nach RIA-Bestimmung noch in der Sättigung liegen und drei weitere wurden auf positiven und negativen Zielzellen getestet.

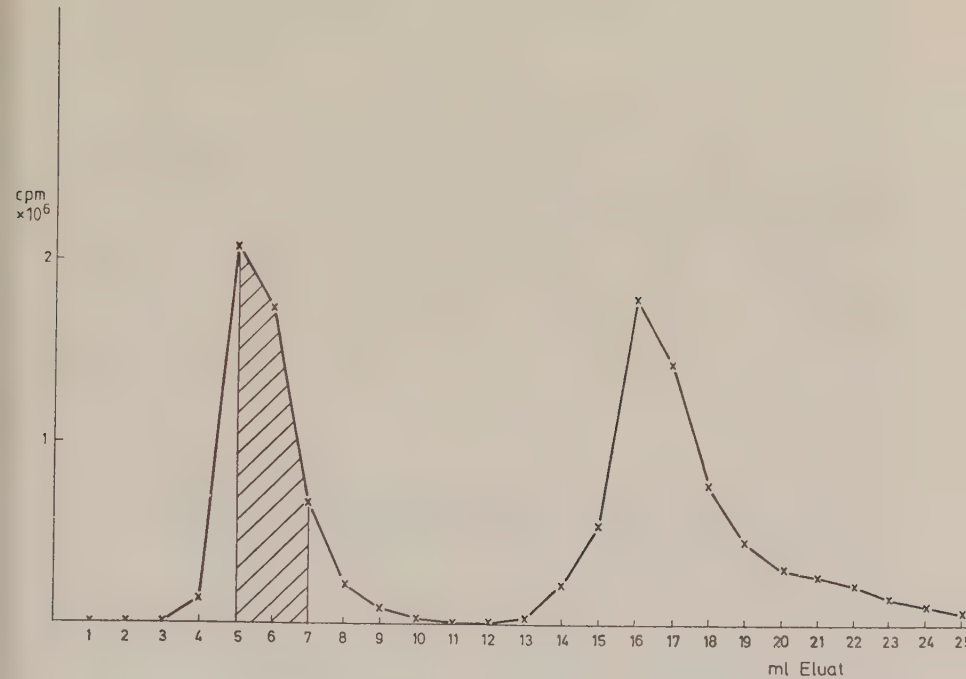


Abbildung 3

Abtrennung des freien ³H-NSP von der Antikörperfraktion nach der Radiotritierung durch Gelfiltration

1. Gipfel: Antikörper (die 3 Fraktionen mit hoher Antikörperkonzentration-schraffierte Fläche- wurden für die Inkubation der Zellen verwendet)
2. Gipfel: Freies ³H-NSP

Zugleich wurden verschiedene Expositionszeiten getestet, um die optimale Zeit zu finden. Diese optimale Expositionszeit muß ausreichend lang dauern, um dem radioaktiven Antikörper zu ermöglichen, durch Abgabe seiner Strahlung auf die Emulsion einwirken zu können und damit ein Latentbild zu erzeugen. Gleichzeitig darf sie, besonders bei quantitativen Untersuchungen, nicht den Zeitpunkt überschreiten, zu dem die Silberkörner nicht mehr deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Bei qualitativen Untersuchungen wird eine gewisse Überexposition in Kauf genommen. Dabei ist nur wichtig, daß der Zeitpunkt erfaßt wird, an dem das positive Signal zum Untergrundrausch noch hoch ist.

Die Verdünnungen ab 100 000 cpm wurden auf fixierten und Objektträger adhärierten Zielzellen angesetzt und jeweils 2 Autoradiogramme nach 2, 4, 8 und 24 Stunden entwickelt. Ab 24 Stunden wurden alle Thymozyten markiert, wie es auf Tabelle 3 zu sehen ist.

1.1.4. Quantitative Tritium-Immunaautoradiographie

Unter gewissen Voraussetzungen geben Autoradiogramme nicht nur einen Überblick über den Prozentsatz der positiven und negativen Zellen, sondern erlauben auch verhältnismäßig genaue quantitative Bestimmungen der Aktivitätsverteilung (Thiel et al, 1976).

Ob auch Tritium-markierte Antikörper, die die Strukturen auf der Zelloberfläche erkennen, mit Autoradiographie quantifizierbar sind, wurde mit folgenden Experimenten geprüft. AKR- und AKR/BALB-Thymozyten und Lymphknotenzellen wurden mit ^3H -markierten anti-Thy-1.1-Antikörpern inkubiert und mittels Mikrophotometrie die Anzahl der entwickelten Silberhalogenidkristalle in der photographischen Emulsion ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, daß sich auf Grund der niedrigen Strahlenenergie des Tritiums und auch der unterschiedlichen Dichte der einzelnen Strukturen der Zelle nur eine relative Quantifizierung der

TABELLE 3

Autoradiographie mit ³H-markierten anti-Thy-1.1, anti-Lyt-1 und anti-Lyt-2 monoklonalen Antikörpern

Antikörper	Expositions- zeit	Zellmarkierung							
		Thymozyten ^a				Lymphknotenzellen			
		^b +	++	+++	gesamt Zellzahl	+	++	+++	gesamt Zellzahl
anti- Thy-1.1	2 ^h	28	1	0	29	3	0	0	3
	4 ^h	80	0	0	80	18	1	0	19
	8 ^h	76	3	0	79	10	17	2	29
	24 ^h	0	3	91	94	1	26	10	37
	2 Tage	4	0	91	95	5	7	34	46
	5 Tage					0	0	46	46
anti- Lyt-1	2 ^h	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 ^h	0	0	0	0	0	0	0	0
	8 ^h	0	0	0	0	0	0	0	0
	24 ^h	43	4	2	49	31	0	0	31
	2 Tage	33	18	3	54	10	26	2	38
	5 Tage	24	40	16	80	9	22	25	56
	30 Tage					0	0	56	56
anti- Lyt-2	2 ^h	0	0	0	0	0	0	0	0
	4 ^h	0	0	0	0	0	0	0	0
	8 ^h	71	0	0	71	10	0	0	10
	24 ^h	0	82	5	87	18	0	0	18
	2 Tage	1	3	84	88	1	3	14	19
	5 Tage	0	3	84	87	3	2	17	22
	30 Tage					0	0	21	21

^a AKR/J (Thy-1.1) Mäuse

^b 5 - 10 Silberkörner pro Zelle +

10 - 20 "- "- "- ++

> 20 "- "- "- +++

Tritium-markierten Präparate durchführen läßt. Da es auf einzelne Vergleiche mehrerer Versuche untereinander ankommt, müssen die betreffenden Autoradiogramme unter den gleichen physikalischen und chemischen Bedingungen entstehen. Diese Voraussetzung trifft am ehesten zu bei der Multispot-Objektträgermethode, wo alle zu untersuchenden Zellen auf einem Objektträger verarbeitet werden können.

TABELLE 4

Photometrische Messungen der AKR/J (P) und AKR/J x BALB (F1) Thymozyten und Lymphknotenzellen, inkubiert mit ³H-markierten anti-Thy-1.1

		Photometrie
P	Thymus	466 + 99
P	Lymphknoten	183 + 62
F1	Thymus	355 + 69
F1	Lymphknoten	147 + 42

		Antigenmengen- verhältnis
Thymus	P:F1	1,31 + 0,38
Lymphknoten	P:F1	1,25 + 0,36
P	Thymus: Lymphknoten	2,55 + 1
F1	Thymus: Lymphknoten	2,42 + 0,8

P = AKR/J

F1 = (AKR/J x BALB)

Die Thy-1.1 Antigendichte bei Thymozyten ist, sowohl in AKR/J als auch in AKR/JxBALB Mäusen, 2,5 mal höher als bei Lymphozyten (Tabelle 4). Um diese Ergebnisse mit denen des RIA zu vergleichen (R. Schuh, persönliche Mitteilung), ist zu beachten, daß, im Gegensatz zur Autoradiographie, wo Einzelzellen gemessen werden, RIA einen summarischen Wert von allen Zellen gibt. Da bei den Lymphknoten der T-Zell-Anteil nur 50% beträgt, müssen die Meßwerte um den Faktor 2 korrigiert werden.

Um ein genaueres System zu haben, wurden parentale (AKR/J;P) und F1 (AKR/JxBALB)-Mäusezellen verglichen. Da AKR/J-Thymozyten oder Lymphknotenzellen theoretisch zweimal so viel Thy-1.1-Antigene wie der AKR/JxBALB-Hybrid haben, wurden sie als Indikatorsystem genommen. Mittels photometrischer Messungen wurde die AKR/J-Antigendichte im Vergleich zu AKR/JxBALB bestimmt, was ein Verhältnis von P:F1 um 1,3:1 ergibt.

Die theoretische Voraussetzung, daß das Hybrid tatsächlich 50% Thy-1.1 und genausoviel des anderen Allelprodukts Thy-1.2 auf seinen T-Zellen hat, wurde mit diesem Versuch nicht bestätigt.

1.2. Doppelmarkierung

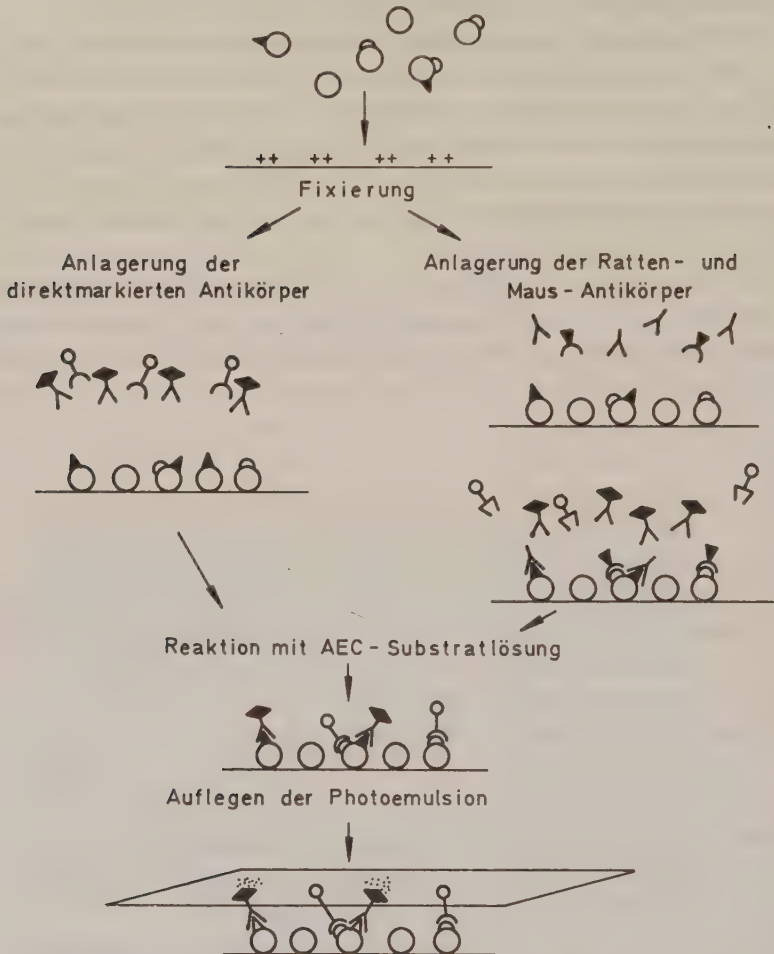
Die Doppelmarkierungsmethode wurde für den gleichzeitigen Nachweis von zwei verschiedenen Zellmembranstrukturen auf Einzelzellen entwickelt. Das ist eine neue Kombination von Immunautoradiographie und Immunzytochemie, angewandt auf an Multispot-Objektträger fixierte Zellen. Eine erfolgreiche Doppelmarkierung wurde erzielt, indem die Zellantigene direkt oder indirekt nachgewiesen wurden (Abb.4).

1.2.1. Direkte Methode

Jeder zu analysierende Antikörper wird mit einem farbgebenden Enzym (Peroxidase, Wilson und Nakane, 1978) oder mit Tritium (Kummer, 1986) direkt gekoppelt.

Die auf Multispot-PLL-beschichteten Objektträgern angehefteten Zellen wurden in Glutaraldehyd fixiert und mit dem Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit den Antikörpern kann gleichzeitig oder sequentiell hintereinander durchgeführt werden. Bei der gleichzeitigen Inkubation ist

Zellanheftung auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger



-  - Zellen + Antigene
-  - Ratten-Antikörper
-  - Maus-Antikörper
-  - ³H-markierte Antikörper
-  - Pox-markierte Antikörper

Abbildung 4

Doppelmarkierungsverfahren

Links: Direkte Methode,

Rechts: "Sandwich" Methode

zu beachten, daß die Verdünnung jedes einzelnen Antikörpers das Doppelte von der erwünschten Endkonzentration sein muß.

Da für diese Methode jeder Antikörper entweder mit Peroxidase oder Tritium markiert wird, ist die Durchführung bei mehreren erforderlichen Antikörpern teuer, zeitaufwendig und unpraktisch. Die direkte Doppelmarkierungsmethode ist aber sehr geeignet für Studien, wo nur zwei bestimmte Antikörper und ihr Verhältnis zu verschiedenen Zellarten oder Subpopulationen untersucht wird. Wenn die Antikörper schon markiert sind, ist das Verfahren sehr schnell, weil kein zusätzliches Nachweissystem erforderlich ist.

1.2.2. Die indirekte ("Sandwich") Methode

Da man oft eine ganze Reihe von Antikörpern untersuchen muß, um präzise Schlußfolgerungen zu ziehen, wurde die Doppelmarkierungsmethode so entwickelt, daß jeder Antikörper schnell und einfach eingesetzt werden kann. Dazu wurden die Antikörper selbst unmarkiert verwendet und mit einem Peroxidase- oder Tritium-markierten Sandwich-Antikörper nachgewiesen. Das wurde mittels Antikörpern aus verschiedenen Spezies ermöglicht. Anhand der verschiedenen Herkunft der monoklonalen Antikörper, von Ratte und Maus, können die primären Antikörper separat nachgewiesen werden. Die Methode wurde auf Mäusezellen angewandt. Um die T-Lymphozyten besser zu charakterisieren, wurden die monoklonalen Antikörper anti-Thy-1, anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 und anti-L3T4 verwendet. Der monoklonale Antikörper anti-Thy-1, dessen Antigen von allen T-Zellen exprimiert wird, wurde mit verschiedenen anderen Antikörpern kombiniert.

Die zu kombinierenden Antikörper waren in der Maus (anti-Thy-1.1) und Ratte (anti-Lyt-1, anti-L3T4 und anti-Lyt2) hergestellt worden. Darüberhinaus war die Voraussetzung für diese Doppelmarkierungsmethode der Einsatz von Sandwich-Antikörpern, welche spezifisch nur mit Ratten- bzw. Maus-Immunglobulinen reagieren. Das machte eine Absorption kreuzreagierender Antikörper notwendig (siehe Kapitel B 2.2).

Um die Spezifität der absorbierten Antikörper zu überprüfen, wurden zusätzlich zu jeder Doppelmarkierung auch zwei Kontrollansätze, bei denen die Lymphozyten nur jeweils mit jedem Antikörper markiert wurden, durchgeführt. Die Ergebnisse mehrerer Versuche zeigten, daß bei keinem Individuum ein Unterschied im Prozentsatz der markierten Lymphozyten zwischen Einfach- und Doppelmarkierung besteht (Abb. 5). Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 7 unabhängigen Versuchen sind für die Einfachmarkierung auf Tabelle 7 und für die Doppelmarkierung auf Tabelle 9 zu sehen.

Dadurch, daß die Zahl der positivmarkierten Lymphozyten bei Einfach- oder Doppelmarkierungsverfahren unverändert bleibt, wird die hohe Spezifität des Nachweissystems bestätigt.

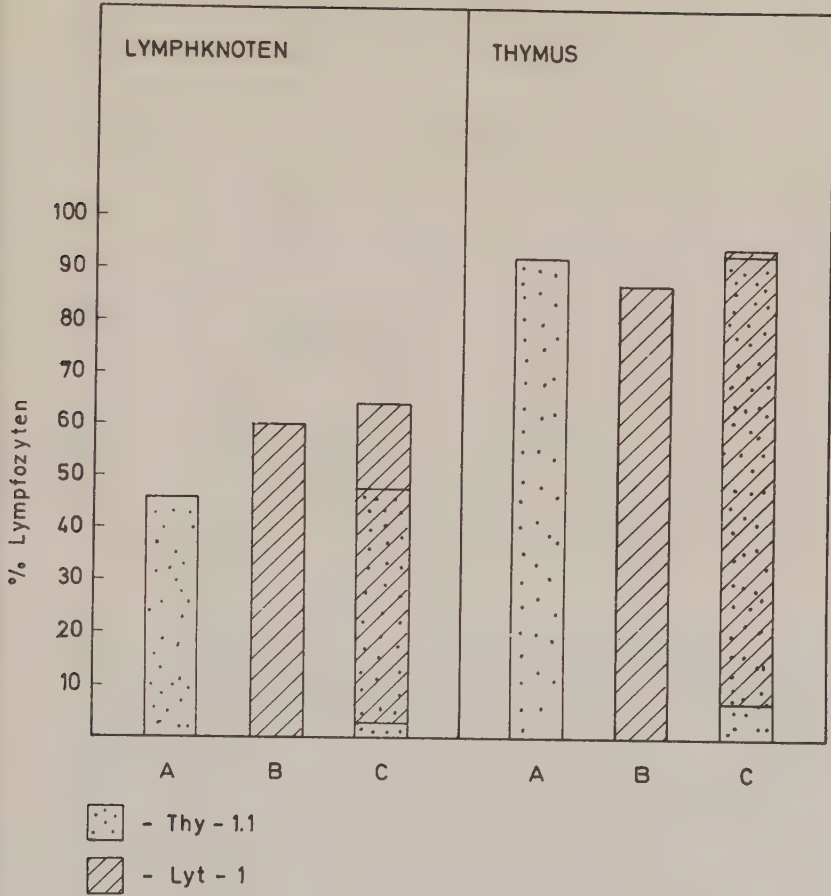
1.2.3 Die optimalen Bedingungen

Für die Doppelmarkierungsmethode wurden optimale Bedingungen geschaffen. Für jeden Antikörper wurde der Sättigungsbereich auf Thymozyten und Lymphknotenzellen bestimmt, und für die ^3H -markierten Antikörper noch zusätzlich die Expositionszeit. Die primären Antikörper können entweder hintereinander oder zusammen auf Zellen aufgetragen werden. Bei dem gleichzeitigen Auftragen der Antikörper muß die Verdünnung zweimal konzentrierter sein.

Für die Peroxidasemarkierung wurde nach dem Kaninchen-anti-Ratte-Immunglobulin Antikörper ein Brückenantikörper Schwein-anti-Kaninchen-Immunglobulin im Überschuß aufgetragen. Dadurch wird eine monovalente Bindung dieses Sekundär-Antikörpers an den Kaninchen-Primärantikörper erreicht. Die freie Valenz bindet im letzten Inkubationsschritt einen Immunkomplex, bestehend aus dem Enzym Peroxidase und Kaninchen-anti-Peroxidase-Antikörper.

Nach der Enzymreaktion wurden die Objektträger mit 1%iger Gelatine bestrichen und mit AR-10 Strippingfilm überzogen. Die optimale Expositionszeit für anti-Thy-1.1

Abbildung 5



Prozentsatz der Thy-1.1 und Lyt-1 positiven Lymphozyten in Lymphknoten und Thymus der Thy-1.1 Maus (AKR/J). Die Zellen wurden mit den ^3H -markierten anti-Thy-1.1 (A), oder peroxidasemarkierten anti-Lyt-1 getrennt inkubiert (B), oder mit den beiden Antikörpern zusammen (C).

Es wurden jeweils 500-1000 Lymphozyten gezählt.

Mittelwerte $\pm$ SD für A und B in Tabelle 7, und für C in Tabelle 6.

war zwei Tage, während anti-Lyt-1 und anti-Lyt-2 fünf Tage brauchten. Nach der Entwicklung und Fixierung folgte 15 min Gegenfärbung in Meyers saurem Hämalaun.

Um die Zahl der Inkubationsschritte zu verringern, wurde anstatt des PAP-Systems ein peroxidasemarkierter Antikörper, Maus-anti-Ratte-Immunglobulin, ausprobiert. Da der Antikörper in der Maus erzeugt wurde, reagierte er nicht mit Maus-Immunglobulinen. Darüber hinaus benötigte dieser Antikörper keine Absorption mit Maus-Immunglobulin wie die für das PAP-Verfahren eingesetzten Kaninchen-Antikörper. Leider zeigte sich, daß dieses System nicht sensitiv genug ist, da das Verfahren der Filmentwicklung und Fixierung allein das Ergebnis der Einfachmarkierung mit anti-Lyt-1 und peroxidasemarkiertem Maus-anti-Ratte-Immunglobulin Antikörper deutlich abschwächt. Dies ist beim PAP-Verfahren nicht zu beobachten. Möglicherweise ist bei geringeren Antigendichten die Peroxidase markierung sehr schwach und benötigt eine Verstärkung durch weitere "Sandwich"-Antikörper oder PAP.

1.2.4 Sensitivität der Methode

Für den Beweis, daß beide Antikörper, die für die Zeldoppelmarkierung angewandt werden, gleich sensitiv nachgewiesen werden können, wurden zwei Versuche durchgeführt.

Zuerst wurde der anti-Thy-1.1 mit Autoradiographie und der anti-Lyt-1 mit der Enzymreaktion nachgewiesen. Dann wurden die Nachweissysteme ausgetauscht, der anti-Lyt-1 radioaktiv und anti-Thy-1.1 mit Peroxidase markiert. Tabelle 5 zeigt, daß die Sensitivität beider Nachweissysteme vergleichbar ist und der Prozentsatz der positiven Zellen unverändert bleibt.

Die zweite Möglichkeit, die Sensitivität der Methode zu prüfen, war ein Doppelnachweis derselben Antikörper. Es wurde ein Antikörper gleichzeitig mit Autoradiographie und mit der Enzymreaktion nachgewiesen. Dazu wurde der anti-

TABELLE 5

Nachweis markierter Zellen in AKR/J Maus-Lymphknoten
und Thymus, verglichen mit zwei Methoden

Organ	Monoklonale Antikörper	Autoradiographie ^a	PAP System ^b
Lymphknoten	Maus-anti-Thy-1.1	51±4 ^c	ND ^d
	Ratte-anti-Lyt-2	22±2	21±1,7
Thymus	Maus-anti-Thy-1.1	93±4	94±2
	Ratte-anti-Lyt-2	86±1,2	84±3

^a ³H-gekoppelte Antikörper

^b Der Antikörper wurde mit dem Peroxidase-anti-Peroxidase-System nachgewiesen

^c Jede Zahl ist der Mittelwert ± Standardabweichung von 3 Versuchen

^d Nicht determiniert, weil mit dem PAP-System auch die Maus-B-Zellen markiert werden (über Sandwichantikörper)

Thy-1.1-Antikörper mit Tritium markiert und mit Zellen inkubiert. Zusätzlich wurde der gleiche Antikörper mit Peroxidase nachgewiesen. Deswegen wurde auf Thy-1.1-positiven Zellen außer der Photoemulsionsschwärzung auch noch die braunrote Färbung gefunden. Da der peroxidasemarkierte Antikörper, der gegen Mäuse-Immunglobuline gerichtet ist, auch Mäuse-B-Zellen erkennt, wurde dieser Versuch auf Maus-Thymozyten durchgeführt. Zusätzlich wurden auch Rattenlymphozyten so getestet.

Rattenlymphozyten sind besonders geeignet, weil sie Thy-1.1 exprimieren, und der sekundäre anti-Maus-Antikörper keine zusätzliche Kreuzreaktivität mit B-Zellen zeigt. Sowohl Mäuse-Thymozyten als auch Rattenlymphozyten wurden nach dem beschriebenen Verfahren doppelt markiert, ohne daß Zellen gefunden wurden, die nur mit einer Markierung positiv gewesen waren.

Das zeigte die Vergleichbarkeit beider Verfahren und beweist die hohe Sensitivität der zwei Systeme.

1.2.5 Vergleich mit anderen Methoden

Die aufgeführte Doppelmarkierungsmethode wurde mit anderen Methoden verglichen. Auf Abbildung 6 ist die Doppelmarkierung mit zwei verschiedenen Fluorochromen demonstriert. Maus-Lymphknotenzellen wurden mit FITC (Fluoro-isothiocyanat) markiertem anti-Thy-1.1 und Rhodamin markiertem anti-Lyt-1 inkubiert. Da jedes Fluorochrom mit einer anderen Wellenlänge angeregt werden muß, ist es nicht möglich, die beiden Markierungen gleichzeitig zu beobachten. Unter diesen Lichtbedingungen ist die Zellmorphologie sehr schwer erkennbar. Ferner bleicht die Fluoreszenz in sehr kurzer Zeit aus, so daß die Präparate gleich ausgewertet werden müssen und auch nicht über längere Zeit aufbewahrt werden können.

Die Doppelmarkierung mittels zweier Enzymreaktionen wurde erfolgreich in der Histologie verwendet (Hoffmann-Fezer, 1982; 1986). Um diese Technik mit der von uns be-

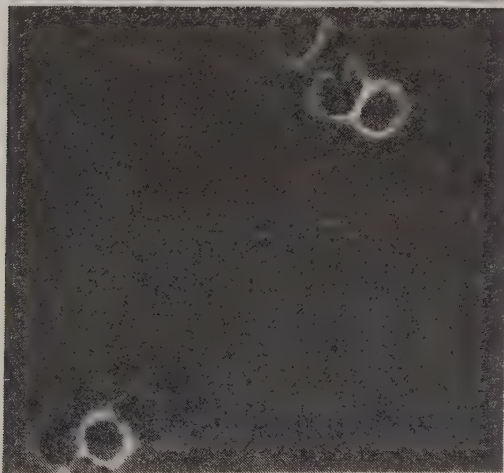
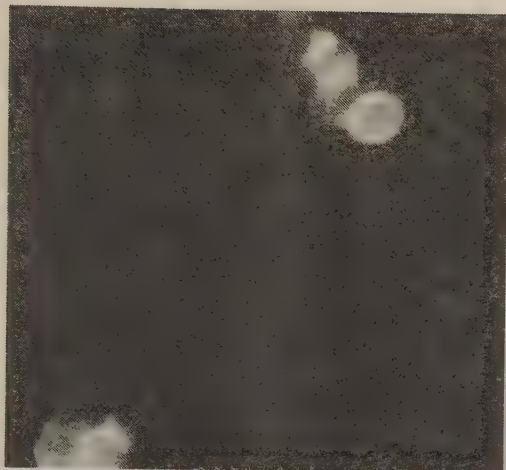
A**B****C**

Abbildung 6

Doppelimmunfluoreszenz. (A) Thy-1.1 - rote Fluoreszenz, (B) Durchlicht, (C) Lyt-1 - grüne Fluoreszenz, (x 1000).

schriebenen Methode zu vergleichen, wurde die Markierung mit zwei Enzymen zur Darstellung auf Einzelzellen adaptiert. Die auf Objektträger fixierten Mäusethymozyten und Lymphknotenzellen wurden mit anti-Lyt-1 und biotinmarkiertem anti-Thy-1.1 inkubiert. Nachdem sie mit PBS gewaschen worden waren, wurde der biotinylierte anti-Thy-1.1 mit einem Peroxidase-markierten Avidin und der anti-Lyt-1 mit β -Galactosidase-markiertem Hammel-anti-Ratte-Immunglobulin nachgewiesen. Die Peroxidase-Reaktion wird mit 3-Amino-9-ethylcarbazol durchgeführt, welches ein unlösliches Reaktionsprodukt ergibt, das die Zelle mit einem rotbraunen Ring markiert. Anschließend wird die β -Galactosidase-Reaktion mit BCIG durchgeführt, damit die zweite Markierung zustande kommt. Die Enzymreaktionen ergeben dauerhafte Farbprodukte, die gleichzeitig im Lichtmikroskop zu erkennen sind.

Obwohl in der Immunhistologie diese Methode den gestellten Anforderungen nahezu vollständig entsprach, erwies sie sich als ungenügend präzise, wenn sie auf Einzelzellen angewandt wurde. Mit unterschiedlichen Enzymen markierte Antikörper identifizieren am besten verschiedene Zellpopulationen, an denen sie verschiedenfarbige Niederschläge katalysieren. Wenn es aber um die Darstellung von zwei verschiedenen Antigenen auf derselben Zelle geht, führt diese immunzytochemische Methode jedoch meist zu undeutlichen Mischfarben (Abb. 7). Abb. 8 zeigt, daß die in Kapitel C 1.2 beschriebene Doppelmarkierungsmethode die Möglichkeit bietet, die zwei verschiedenen Antigene auch auf der gleichen Zelle mühelos voneinander zu unterscheiden. Dabei ist gleichzeitig die Zellmorphologie klar zu beurteilen.

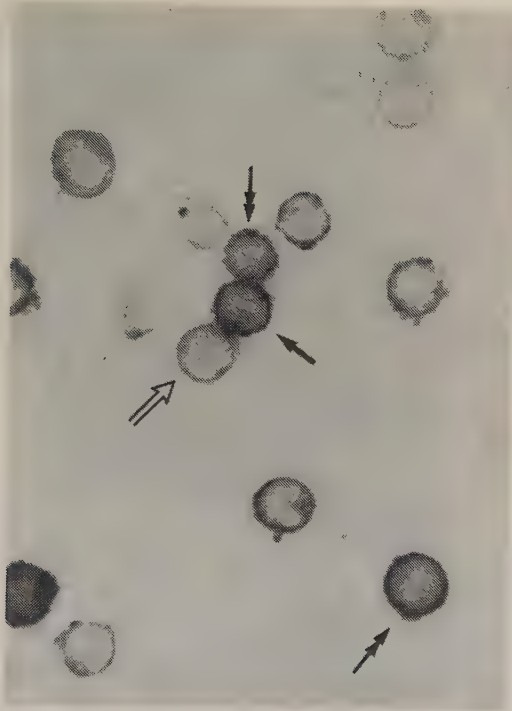


Abbildung 7

Kombination zweier immunzytochemischer
Methoden (Peroxidase/ -Galactosidase), x1300.

→ Thy-1.1⁺-roter Ring

⇒ Lyt-2⁺ -blaugrüner Ring

→ Thy-1.1⁺Lyt-2⁺ -grauer Ring(?) s.Text

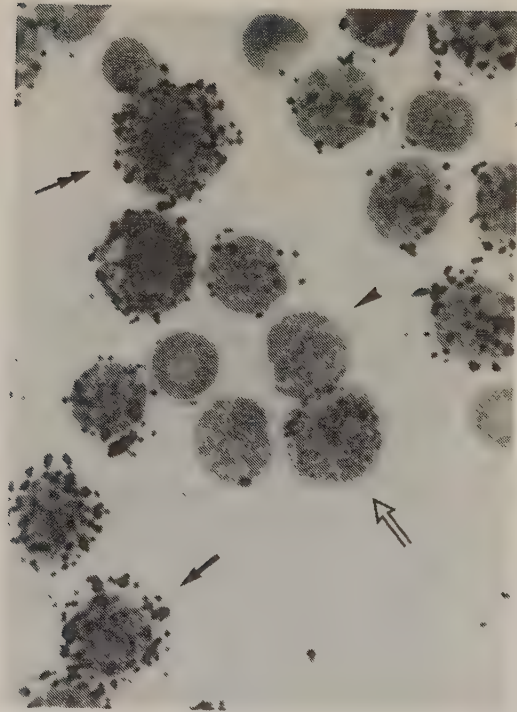


Abbildung 8

Kombination von Immunautoradiographie
und Immunzytochemie: Thy-1.1 -schwarze
Granula, Lyt-2 -roter Ring.

Es sind sowohl doppelt markierte ($\Rightarrow\Rightarrow$)
als auch einfach mit anti-Thy-1.1 ($\Rightarrow$)
oder anti-Lyt-2 ($\Rightarrow\Rightarrow$) und unmarkierte ($\blacktriangleright$)
Zellen zu erkennen, x2100.

2. Klassifizierung von Mäuselymphozyten mittels Doppelmarkierung

Es wurden Mäuselymphozyten-Antigene mittels spezifischer Antikörper analysiert. Um die Zellen und Zellsubpopulationen besser zu charakterisieren und zu klassifizieren, wurden mehrere Antikörper kombiniert angewandt und mittels Einmal- oder Doppelmarkierung nachgewiesen. Dabei erwies sich die Doppelmarkierung für die Bestimmung kleiner Zellpopulationen besonders geeignet. Die Zellen wurden mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1 pan-T-Antikörper markiert. Anti-Lyt-2 und anti-L3T4 wurden als Subpopulationsmarker verwendet.

2.1 Antigenverteilung bei Mäusethymozyten

Im Thymus, wo die T-Lymphozyten geprägt werden, findet man verschiedene T-Zell-Vorstufen bis zu reifen T-Zellen, die schon im Begriff sind, in die Peripherie auszuwandern.

Die meisten Zellen wurden sehr stark mit anti-Thy-1.1 markiert, was einer großen Antigendichte entspricht. Obwohl mit der Tritiummarkierung nur eine relative Quantifizierung möglich ist, kann man die Antigendichte im Thymus und in der Peripherie zum Vergleich heranziehen. Aus diesen Messungen zeigte sich, daß Thymozyten stärker mit anti-Thy-1.1 markiert sind als die peripheren Lymphozyten (Tabelle 4).

Bei gleichzeitigem Nachweis der anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1-Antikörper werden die meisten Zellen (87%) doppelt markiert. Die restlichen Zellen werden einmal-positiv, entweder nur Lyt-1 (2%) oder Thy-1.1 (7%) markiert (Abb. 9 und Tabelle 6).

Um die Thymozytensubpopulationen zu definieren, sind Lyt-2 und L3T4 die meistgeeigneten Antigene. Sie werden erst von Thymozyten exprimiert, weil die Thymozyten-Vorläufer weder Lyt-2 noch L3T4 auf der Zelloberfläche haben.

TABELLE 6

Prozentsatz der doppelpositiven, einfachpositiven und doppelnegativen Lymphozyten in Mäusethymus, Lymphknoten und Milz nach Doppelmarkierung mit T-Zellspezifischen Antikörpern

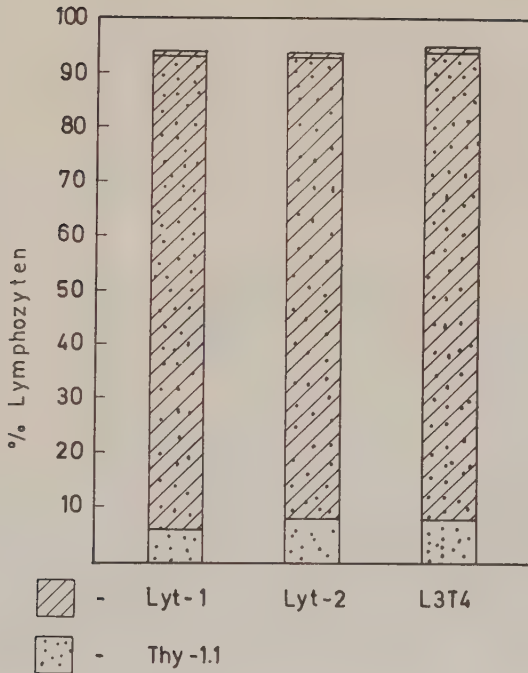
Organ	gleichzeitige Markierung mit	+	+-	-*	--
Thymus	Thy-1.1* und Lyt-1 ⁺	87±2	2±1	7±1,5	4±2
	- " - Lyt-2 ⁺	84±2,3	1±0,6	8±2,2	7±2,2
	- " - L3T4 ⁺	86±1,8	1±0,5	8±1,8	5±1,9
Lymphknoten	Thy-1.1* und Lyt-1 ⁺	48±4	16±3	3±0,6	33±5
	- " - Lyt-2 ⁺	16±4	6±1,2	35±2	43±5
	- " - L3T4 ⁺	39±5	12±2	11±3	38±7
Milz	Thy-1.1* und Lyt-1 ⁺	23±2,6	12±2,3	1±0,6	64±3,2
	- " - Lyt-2 ⁺	7±1,3	3±1	18±5	71±7
	- " - L3T4 ⁺	20±2,5	9±4,7	6±2,6	68±3,6

* ³H-markiert

+ Peroxidase markiert

- Unmarkiert

Abbildung 9



Verteilung der positiven Lymphozyten im Mäuse thymus nach Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 oder anti-L3T4 monoklonalen Antikörpern.

-  - nur Thy-1.1 positive Zellen
-  - Lyt-1, Lyt-2 oder L3T4 positive Zellen, die gleichzeitig Thy-1.1 negativ sind
-  - doppelmarkierte Zellen mit anti-Thy-1.1 und jeweils anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 oder anti-L3T4

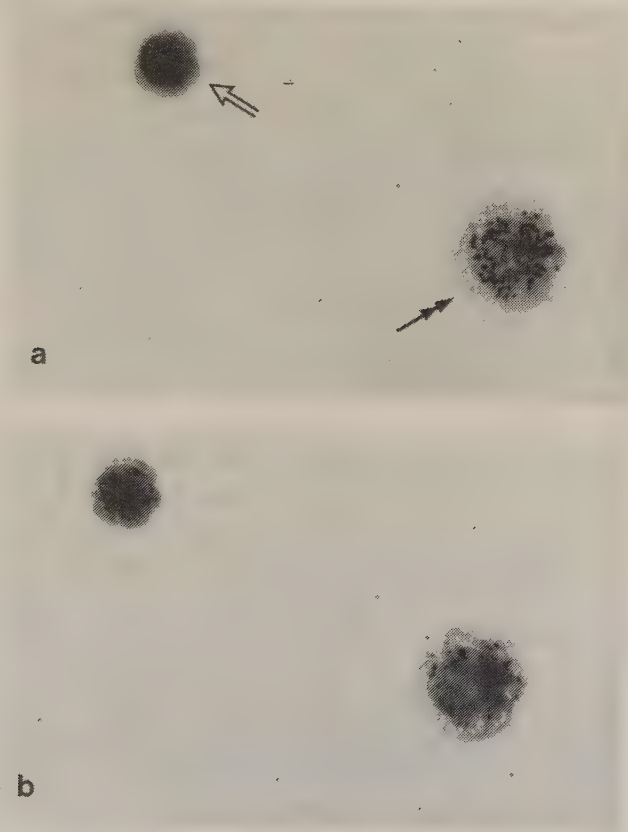
Solche Vorläufer sind wahrscheinlich unter den 3-4% doppelt-negativen Zellen zu finden, die bei gleichzeitiger Markierung mit anti-Lyt-2 und mit dem jetzt im Mäusemodell zur Verfügung stehenden anti-L3T4 unmarkiert bleiben. Der größte Teil der Zellen, 79-82%, ist $\text{Lyt-2}^+\text{L3T4}^+$ und nur 6-7% sind einmal-positiv, entweder Lyt-2^+ oder L3T4^+ .

Eine Variante der Doppelmarkierungsmethode ist, anstatt eines ^3H -markierten Antikörpers ^3H -markiertes Thymidin nachzuweisen, das die teilenden Zellen in ihre DNA einbauen. Dadurch wird es ermöglicht, die proliferierenden Zellen mit Peroxidase-markierten Antikörpern zu charakterisieren und zu definieren (Abb. 10). 10-12% von allen Thymozyten befinden sich in der S-Phase. Die simultane Markeranalyse zeigte, daß alle diese Zellen Thy-1.1^+ sind und davon 94% Lyt-1^+ 92% Lyt-2^+ und 91% L3T4^+ sind. Ca. 5% der teilenden Thy-1.1^+ Zellen bleiben Lyt-1^- , Lyt-2^- , L3T4^- .

2.2 Antigenverteilung bei Mäuselymphknotenzellen

In Tabelle 7 sind die Lymphozyten von AKR/J, C57BL/6, CBA- und BALB_Mäuse-Lymphknoten, die mit verschiedenen Antikörpern spezifisch reagieren, prozentual aufgeführt. Die positiv-markierten Lymphozyten wurden mit der PAP-Methode nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, daß die Zahl der mit den verschiedenen monoklonalen Antikörpern markierten Lymphozyten jeweils zwischen verschiedenen Mäusestämmen variiert. Die C57BL/6-Mäuse haben im Vergleich zu anderen Mäusestämmen den niedrigsten Prozentsatz von Lyt-1^+ Lymphknotenzellen, während der Prozentsatz der Lyt-2^+ Lymphozyten bei diesen Mäusen sich nicht von dem bei anderen Mäusestämmen unterscheidet. Die Zahl der L3T4^+ Lymphknotenzellen ist verschieden bei jedem Stamm und variiert von $32\pm 5\%$ bei C57BL/6 bis $58\pm 0,7\%$ bei CBA-Mäusen. Den niedrigsten Prozentsatz an Thy-1^+ Lymphknoten-

Abbildung 10



Kombination von Autoradiographie und Immun-
zytochemie:

- Zelle, die ^3H -Thymidin in ihre DNA
eingebaut hat (schwarze Granula)
- ⇒ Peroxidasemarkierte Zelle, die mit
anti-Lyt-2 und PAP-komplex nachgewiesen
wurde (roter Ring)

Schärfereinstellung auf:

a) Silberkornebene

b) Zellebene mit enzymkatalysiertem Niederschlag
(x1300)

TABELLE 7

Verteilung der Lymphozyten in Mäusemilz und Lymphknoten nach Markierung mit T-Zellspezifischen monoklonalen Antikörpern (PAP Methode)

Stamm	Organ	Lyt-1 ⁺	Lyt-2 ⁺	L3T4 ⁺	Thy-1.1 ⁺	Thy-1.2 ⁺
AKR/J	Lymphknoten	62±3 ^a	21±2	50±3	50±3	
	Milz	35±2	11±0,6	30±3	24±2,8	
C57BL/6	Lymphknoten	54±3	24±0,6	32±5		47±2,8
	Milz	38±0,7	14±4	27±2,5		32±4
CBA	Lymphknoten	67±2,1	22±4	58±0,7		65±3,2
	Milz	33±1,8	10±1,4	24±0,7		28±2,5
BALB	Lymphknoten	59±0,7	17±1	40±2		63±3,5
	Milz	32±3	9±0,6	25±2,8		31±3

^a Mittelwerte von mindestens fünf Mäuse pro Gruppe ± Standardabweichung (SD).
500 Zellen pro Maus ausgewertet

zellen haben die C57BL/6- und AKR/J-Mäuse. Interessanterweise ist bei AKR/J-Mäusen die Zahl der Thy-1.1⁺-Lymphknotenzellen 51[±]3%, während 62[±]3% Lymphozyten Lyt-1⁺ sind. Da anti-Thy-1- und anti-Lyt-1-Antikörper als pan-T-Lymphozytenmarker gelten, ist dieser Unterschied bei AKR/J-Mäusen überraschend. Um den Phänotyp der T-Lymphozyten und deren Verteilung zu bestimmen, wurde anti-Thy-1.1 als pan-T-Marker gleichzeitig mit anderen T-Zell-spezifischen Antikörpern angewandt.

Die simultane Doppelmarkierung der Lymphozyten mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1 zeigte, daß die zwei Antikörper etwas verschiedene Zellpopulationen erkennen. Obwohl die meisten Lymphozyten mit beiden Antikörpern gleichzeitig markiert sind, ist eine Population (16%) nur Lyt-1 positiv und 3% der Zellen sind Lyt-1⁻ Thy-1.1⁺ (Abb.11). Die Lymphozyten, die nur eines der beiden Antigene exprimieren, sind im Vergleich zu doppelt-markierten Zellen relativ stärker markiert, was einer größeren Antigendichte entspricht.

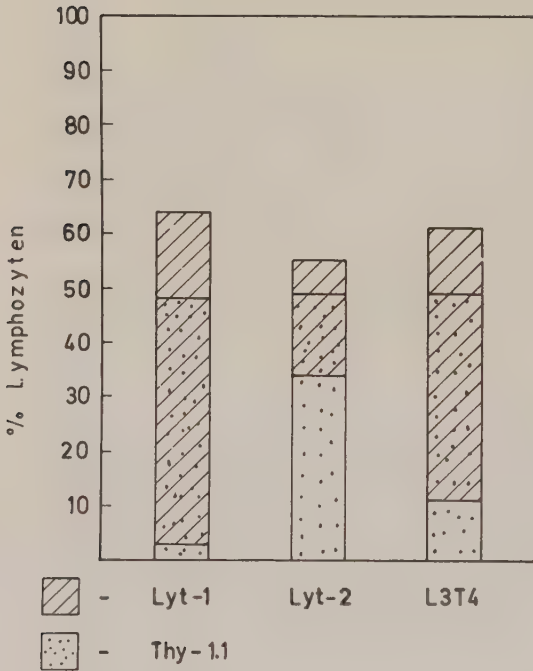
Die doppelt-negativen Lymphozyten in Lymphknoten sind von der B-Zellreihe. Mittels eines peroxidase-markierten anti-Maus-Ig-Antikörpers wurde gezeigt, daß 35-38% der Lymphozyten Immunglobuline auf der Oberfläche tragen. Abbildung 11 zeigt die Verteilung der Subpopulationsmarker anti-Lyt-2 und anti-L3T4 in Kombination mit dem anti-Thy-1.1.

Der Supressorzellmarker Lyt-2 ist bei 22% der Lymphknotenzellen exprimiert. 16% koexprimieren Thy-1.1, und 6% sind nur Lyt-2 positiv.

Der für die Helferpopulation charakteristische anti-L3T4-Antikörper markiert 51% der Lymphozytenzellen.

Wenn anti-Thy-1.1 und anti-L3T4 gleichzeitig angewandt werden, sind 38% der Lymphozyten doppelt-markiert, 11% sind nur Thy-1.1⁺ und 12% sind Thy-1.1⁻ aber L3T4⁺. Die 39% doppelt-positiven Zellen ergänzen sich nicht mit den 16% Thy-1.1⁺ Lyt-2⁺ Zellen auf die gesamte Zahl

Abbildung 11



Verteilung der positiven Lymphozyten im Mäuse-
lymphknoten nach Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1
und anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 oder anti-L3T4 monoklonalen
Antikörpern.

-  - nur Thy-1.1 positive Lymphozyten
-  - Lyt-1, Lyt-2 oder L3T4 positive Lymphozyten,
die gleichzeitig Thy-1.1 negativ sind
-  -doppeltpositive Lymphozyten mit anti-Thy-1.1
und jeweils anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 oder
anti-L3T4

Mittelwerte und SD s. Tabelle 6

der Thy-1.1⁺ Zellen im Lymphknoten. Zusätzlich zeigten kombinierte Markierungen, daß anti-L3T4 und anti-Lyt-2 zusammen $6 \pm 2\%$ weniger Zellen erkennen, als die rechnerische Summe von der Lyt-2⁺- und L3T4⁺-Zellen beträgt (Tabelle 8).

TABELLE 8

Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 einerseits und anti-Lyt-2 und anti-L3T4 andererseits

Thy-1.1 ^a und:			Rechnerisch erwartet
Lyt-2 ^b	L3T4 ^b	Lyt-2+L3T4 ^b	Lyt-2+L3T4
15+0,2	38+1,5	47+2,1	53+1,5

^a₃H-markiert

^bPox-markiert

Mittelwerte und SD von 6 Versuchen

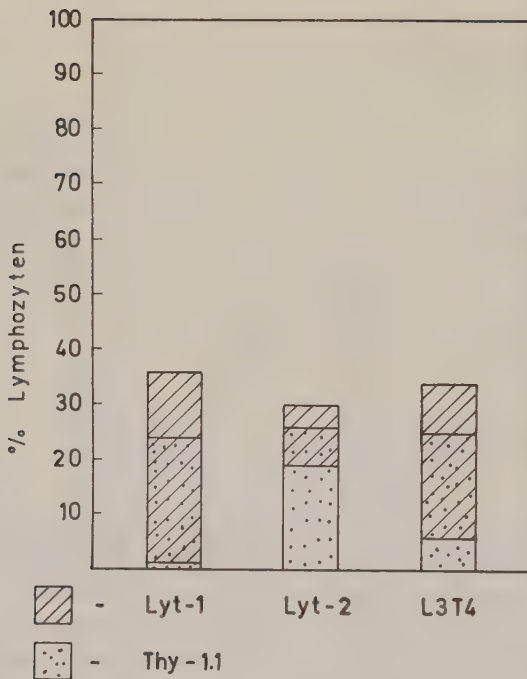
2.3 Antigenverteilung bei Mäusemilzzellen

Milzlymphozyten verschiedener Mäusestämme wurden mit T-zellspezifischen Antikörpern markiert und mit der PAP-Methode nachgewiesen (Tabelle 7). Die Ergebnisse zeigen, daß zwischen Milzlymphozyten verschiedener Mäusestämme keine signifikanten statistischen Unterschiede bestehen, mit Ausnahme des Prozentsatzes der Thy-1.1⁺-Lymphozyten in der AKR/J Milz, der kleiner als in der Milz anderer Mäusestämme und der auch niedriger ist als der Prozentsatz der Lyt-1⁺-Milzzellen.

Um das genauer zu untersuchen, wurde ein Tritium-markierter anti-Thy-1.1-Antikörper mit anderen T-zell-spezifischen Antikörpern gleichzeitig angewandt. Die Verteilung der T-Zellmarker in der Milz ist in Abbildung 12 gezeigt.

24% der Lymphozyten sind mit anti-Lyt-1 und anti-Thy-1.1 doppelt positiv. Ähnlich wie in den Lymphknoten wurden Zellen gefunden, die entweder Lyt-1⁺ Thy-1.1⁻ ($12 \pm$

Abbildung 12



Verteilung der positiven Lymphozyten in der Mäuse-
milz nach Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und
anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 oder anti-L3T4 monoklonalen
Antikörpern.

-  - nur Thy-1.1 positive Zellen
-  - Lyt-1, Lyt-2 oder L3T4 positive Zellen, die gleichzeitig Thy-1.1 negativ sind
-  - doppelpositive Zellen mit anti-Thy-1.1 und jeweils anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 oder anti-L3T4

Mittelwerte und SD in Tabelle 6

2,3) oder $\text{Lyt-1}^- \text{Thy-1.1}^+$ ($1 \pm 0,6\%$) sind. Da diese $\text{Lyt-1}^- \text{Thy-1.1}^+$ -Zellen nur 1% der gesamten Lymphozyten sind, können sie nur mit der Doppelmarkierung entdeckt werden. Die 12% Lyt-2^+ -Lymphozyten werden nicht ganz in der Thy-1.1 Population erfaßt. 7% Lyt-2^+ -Zellen sind auch Thy-1.1 -positiv.

Wenn die Milzzellen mit anti- Thy-1.1 und anti- L3T4 gleichzeitig markiert werden, findet man 9% $\text{Thy-1.1}^- \text{L3T4}^+$ -Lymphozyten.

3. Anwendung der Doppelmarkierungsmethode für die Zellanalyse bei Graft-versus-Host-Reaktion (GvH)

Um das Verhalten sowie die Verteilung der Spenderlymphozyten in einem letal bestrahlten Empfänger zu beobachten, erwies sich die Doppelmarkierungsmethode als besonders geeignet.

Letal bestrahlte C57BL/6-Empfängermäuse wurden mit AKR-Lymphozyten transplantiert. Dadurch, daß sich diese beiden Mäusestämme im H-2 Locus unterscheiden (H-2b versus H-2k), werden die Spenderlymphozyten im Empfänger stimuliert und die akute GvH-Krankheit ausgelöst. Da die GvH-Reaktion überwiegend durch T-Lymphozyten getragen ist, wurden mit Hilfe des anti- Thy-1.1 -Antikörpers, der nur von den Spenderlymphozyten (AKR) ausgeprägt wird, diese Zellen im Empfänger verfolgt. Die Spender-T-Lymphozyten wurden in bestimmten Zeitabständen nach der Transplantation nachgewiesen und zugleich wurden sie mit anderen Antikörpern charakterisiert. Damit werden T-Zellsubpopulationen definiert, welche ursächlich für die Auslösung der GvH-Krankheit betrachtet werden können.

Die C57BL/6-Mäuse wurden mit jeweils 10^7 AKR-Knochenmark und Lymphknotenzellen transplantiert. Vier Tage nach der Transplantation zeigten sich die Symptome der akuten GvH-Krankheit sehr deutlich, und die Tiere starben am

sechsten oder siebten Tag. Dieser Verlauf war mit raschem Gewichtsverlust verbunden. Zusätzlich bestätigten histologische Untersuchungen die GvH-Diagnose. Da die Krankheit etwa 7 Tage dauert, wurden jeweils 6 Tiere am zweiten, vierten und sechsten Tag getötet, um die Entwicklung der GvH-Reaktion durch die Zelltypisierung zu untersuchen. Am 4. Tag nach der Transplantation waren die Milzen deutlich vergrößert, was auch ihr Gewichtsanstieg von 46 ± 2 mg (2. Tag) auf 100 ± 4 mg (4. Tag) zeigte.

Immunhistochemisch war eine Umorganisation der Milz, insbesondere im Bereich der weißen Milzpulpa, zu beobachten. Es zeigte sich eine unregelmäßige Infiltration der gesamten weißen Pulpa mit überwiegend Thy-1.1⁺Lyt-2⁺-doppelt-positiven Zellen, die die bei Kontrolltieren ausgebildete klare Trennung zwischen T- und B-Zellzone der weißen Pulpa verwischte (Abb. 13).

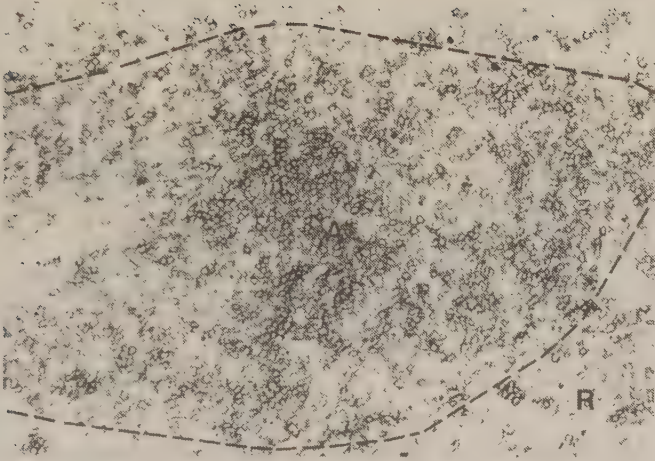
3.1 Nachweis der Lymphozyten des Spenders im Empfänger mit gleichzeitiger Bestimmung der Subpopulationen

3.1.1 Thy-1.1 und Thy-1.2

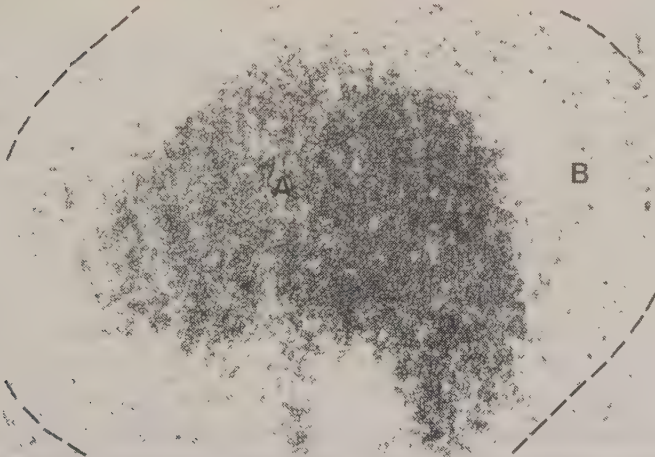
Der Anteil an den Thy-1.1⁺-Spenderzellen war am zweiten Tag nach der Transplantation $7 \pm 2\%$ der gesamten Milzlymphozyten und stieg am 4. Tag auf $49 \pm 5\%$ an (Abb. 14). Das zeigte eine starke Stimulierung und Proliferation der T-Lymphozyten, die am 4. Tag nach der Transplantation den höchsten Punkt erreichte. Im Vergleich ist der T-Zell-Prozentsatz in der Milz von unbehandelten Mäusen nur $32 \pm 4\%$. Gleichzeitig wurden die Empfänger Thy-1.2⁺-Lymphozyten nachgewiesen. Sie nahmen rasch ab. Schon am 2. Tag nach der Transplantation betrugen sie $10 \pm 3\%$ der Lymphozyten in der Milz, am 4. Tag nur noch $3 \pm 1\%$ und am sechsten Tag waren sie nicht mehr zu finden.

Im Vergleich dazu haben die Milzen der bestrahlten aber nicht transplantierten C57BL/6-Mäuse am zweiten Tag $22 \pm 3\%$ Thy-1.2⁺-Lymphozyten.

Abbildung 13



- a) Akute GvH Reaktion in der Milz. Gesamte weiße Milzpulpa (umrandet) und angrenzende rote Pulpa (R) unregelmäßig durchsetzt von Thy-1.1⁺ Spender Lymphozyten (überwiegend große Blasten), A=Zentralarteriole, x130.



- b) Zum Vergleich periarteriolarer Lymphozytenmantel dicht besiedelt von Thy-1.2⁺ Lymphozyten in der weißen Pulpa (umrandet) einer unbehandelten C57BL/6 Maus, A= Zentralarteriole, B= periphere B-Zellzone, x130.

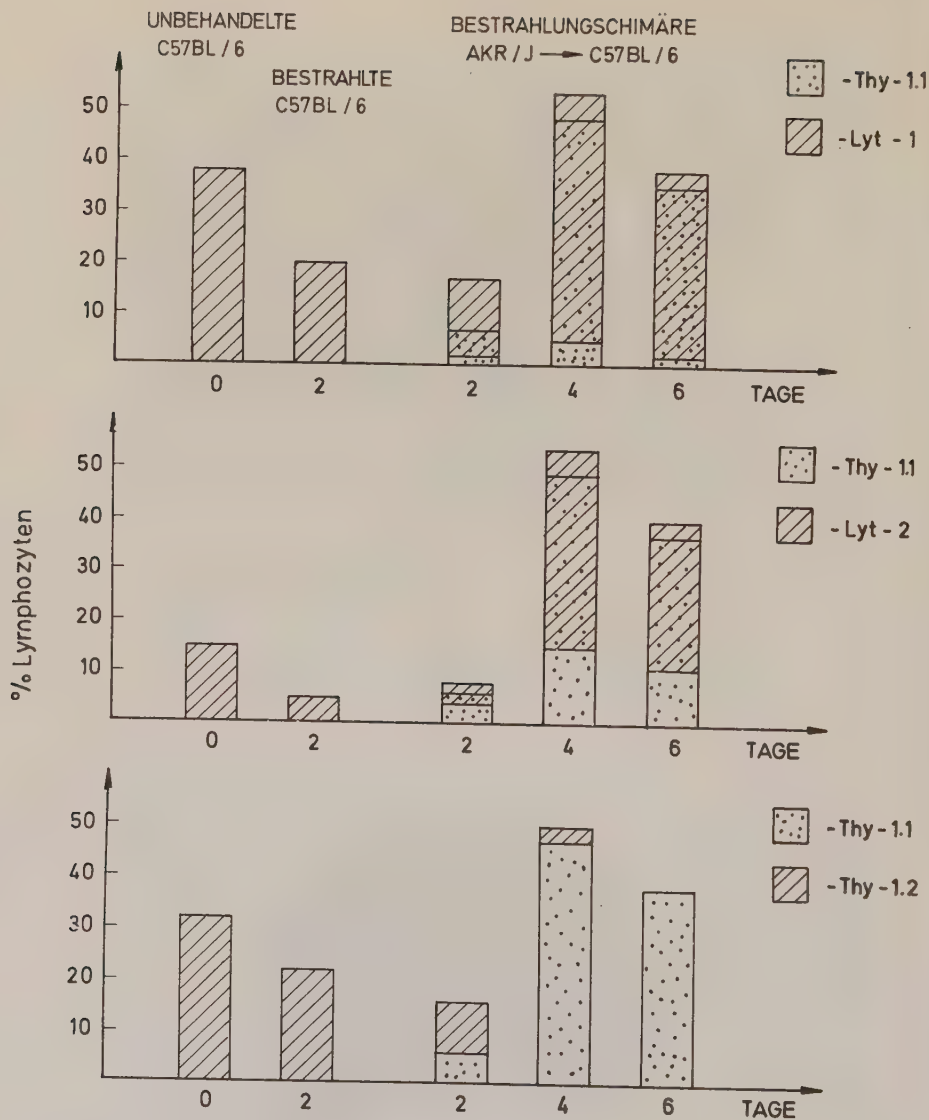


Abbildung 14

Verteilung der Spenderlymphozyten (AKR/J; Thy-1.1) in der Milz von letal bestrahlten (8 Gy) Empfänger (C57BL/6; Thy-1.2) am 2., 4., und 6. Tag nach der Transplantation

Oben: Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1

Mitte: -"- -"- -"- -"- anti-Lyt-2

Unten: -"- -"- -"- -"- anti-Thy-1.2

Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen (SD siehe Text).

Als Kontrolle wurden AKR/J-Lymphozyten und Knochenmarkzellen auch syngen transplantiert (AKR/J $\rightarrow$ AKR/J; Abb.15). Der Prozentsatz der Thy-1.1⁺-Lymphozyten nahm in den ersten 6 Tagen ab, und nach 14 Tagen war ein Anstieg der T-Lymphozyten in der Milz wahrzunehmen. Da in diesem Fall die Spender- und Empfängerzellen nicht voneinander zu unterscheiden waren, wurde eine kongene Kontrolle angesetzt. Dazu wurden AKR/J-Lymphozyten und Knochenmarkzellen in AKR/Cu-Mäusen, die sich von AKR/J-Mäusen nur im Thy-1-Lokus unterscheiden (Thy-1.1 versus Thy-1.2; John et al, 1972), transplantiert. Abb. 16 zeigt, daß die Empfänger(Thy-1.2⁺)Lymphozyten noch zwei Wochen nach der Transplantation nachgewiesen werden konnten.

Im Vergleich zur allogenen Transplantation, bei der T-Lymphozyten sehr schnell proliferieren, nehmen in den kongenen AKR/Cu Mäusen die Spender(Thy-1.1⁺)-Zellen langsamer und gleichmäßiger zu; von $2 \pm 1\%$ am dritten, $3\% \pm 2$ am fünften, $11 \pm 0,5\%$ am siebten auf $21 \pm 4\%$ am dreizehnten Tag nach der Transplantation (Abb. 16).

3.1.2 Lyt-1

Um die gesamte Spender- und Empfänger-T-Zellpopulation zu erfassen, wurde eine Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1 durchgeführt. Am zweiten Tag nach der allogenen Lymphozytentransplantation stimmte die Zahl der Lyt-1⁺-Zellen mit den zusammengenommenen Thy-1.1⁺ und Thy-1.2⁺-Zellen überein (Abb. 14). Am vierten Tag waren die Lyt-1⁺-Lymphozyten $49 \pm 2\%$, was der Summe von $47 \pm 2\%$ Thy-1.1⁺ und $2 \pm 0,5\%$ Thy-1.2⁺-Lymphozyten entspricht. Erst die Doppelmarkierung mit anti-Lyt-1 und anti-Thy-1.1 zeigte, daß $5 \pm 2\%$ der Lymphozyten Thy-1.1⁺ Lyt-1⁻ sind. Dieser hohe Anteil an nur Thy-1.1⁺-Zellen war am sechsten Tag wieder auf $2 \pm 0,5\%$ abgefallen, wie es auch in der normalen Milz der Fall war. Bei der syngeneten Kontrolle wurden am 2. Tag nach der Transplantation $6 \pm 2\%$ der Zellen Thy-1.1⁺ Lyt-1⁻, aber schon ab dem vierten Tag waren sie wieder um $1 \pm 0,3\%$ wie in der normalen Milz.

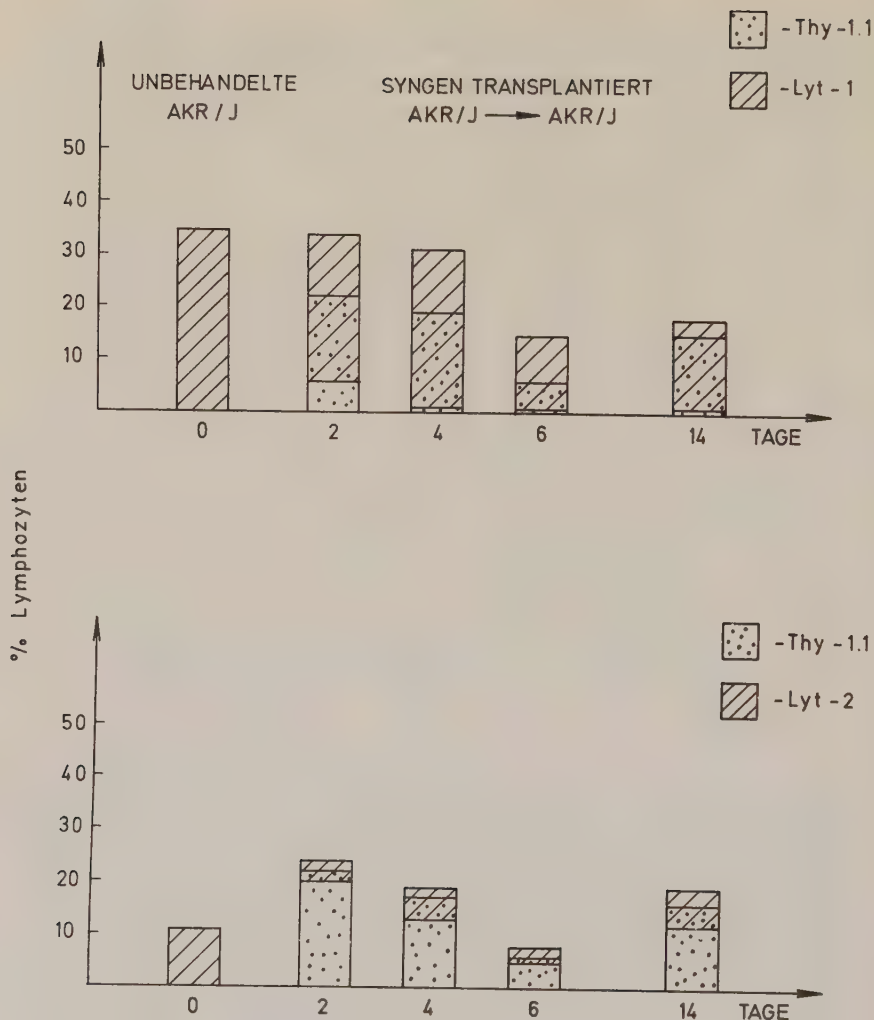


Abbildung 15

Lymphozytenverteilung in der Milz von letal bestrahlten (8 Gy) Empfängern am 2., 4., 6. und 14. Tag nach syngener Transplantation (AKR/J → AKR/J).

Oben: Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1

Unten: -"- -"- -"- -"- anti-Lyt-2

Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen (SD siehe Text).

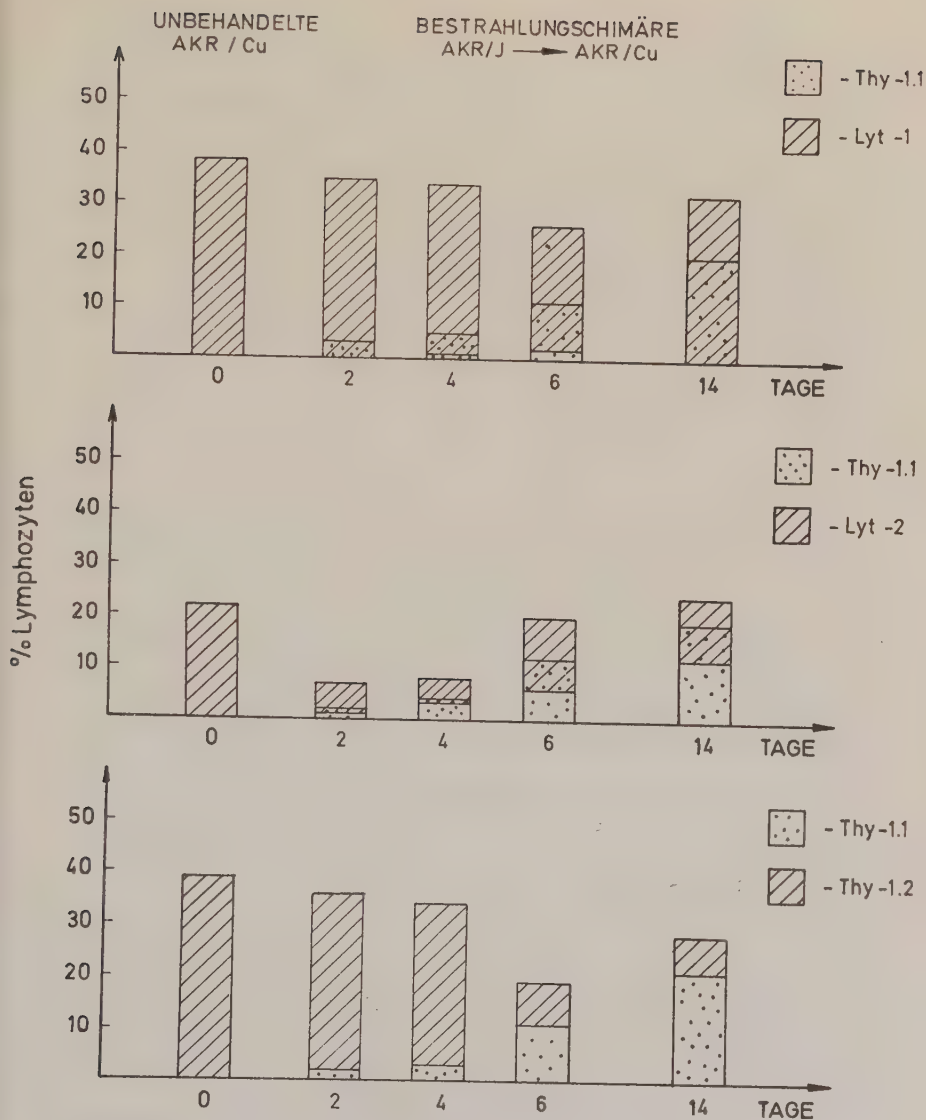


Abbildung 16

Verteilung der Spenderlymphozyten (AKR/J; Thy-1.1) in der Milz von letal bestrahlten (8 Gy) congenen Empfängern (AKR/Cu; Thy-1.2) am 2., 4., 6. und 14. Tag nach der Transplantation.

Oben: Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1
Mitte: -"- -"- -"- -"- anti-Lyt-2
Unten: -"- -"- -"- -"- anti-Thy-1.2

Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen (SD siehe Text).

Interessanterweise wurden am sechsten Tag nach der Lymphozytenübertragung $3 \pm 1\%$ Lyt-1^+ Thy-1.1^- -Zellen gefunden, die gleichzeitig auch keine Thy-1.2 -Antigene nachwiesen. Gleiche Zellen waren auch bei der kongenen Kontrolle (AKR/J -- AKR/Cu) ab dem sechsten Tag (6-7%) zu finden (Abb. 16). Bei der syngenen Kontrolle war der Anteil an Lyt-1^+ Thy-1.1^- -Zellen $11 \pm 2\%$ am 2., 4. und 6. Tag, was der Verteilung bei der normalen Milz entspricht. Erst nach 14 Tagen, als eine Steigerung der Thy-1.1^+ -Zellen beobachtet wurde, betrugen die Lyt-1^+ Thy-1.1^- -Lymphozyten $3 \pm 1,5\%$.

3.1.3 Lyt-2

Um die T-Zellsubpopulationen nachzuweisen, wurden die Milz-Zellen zugleich mit anti- Thy-1.1 - und anti- Lyt-2 -Antikörpern inkubiert. In der allogenen Gruppe waren am 2. Tag $2 \pm 0,2\%$ Spender- Lyt-1^+ -Lymphozyten (doppelmarkierte Zellen Thy-1.1^+ Lyt-2^+) und nur noch $2 \pm 0,5\%$ Thy-1.1^- Lyt-2^+ -Zellen vorhanden. Im Vergleich dazu wurden in der bestrahlten und nicht transplantierten Kontrolle am gleichen Tag doppelt so viele Lyt-2^+ Lymphozyten nachgewiesen ($5 \pm 0,6\%$) (Abb. 14).

Am vierten Tag, an dem die Thy-1.1^+ -Lymphozyten sehr stark anstiegen, war der größte Teil der Spenderzellen Lyt-2^+ ($39 \pm 5\%$). Das Verhältnis dieser Lyt-2^+ -Zellen zu den Thy-1.1^+ Lyt-2^- -Lymphozyten wurde 2,5:1 im Gegensatz zu einem normalen Verhältnis von 1:2 bei unbehandelten Tieren, und blieb auch am sechsten Tag unverändert. Abb. 14 zeigt, daß auch die Thy-1.1^+ Lyt-2^- -Lymphozyten anstiegen, nämlich von $4 \pm 1\%$ am zweiten auf $15 \pm 3\%$ am vierten Tag. Im Vergleich dazu entwickelten sich bei der syngenen Kontrolle die beiden Subpopulationen (Lyt-2 und Lyt-2^-) parallel, und ihre Relation war immer 1:2 (Abb. 15).

D DISKUSSION

1. Die Methode

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode für den gleichzeitigen Nachweis zweier verschiedener Antigene auf Einzelzellen dargestellt. Sie besteht aus einer Kombination von immunautoradiographischen mit immunzytochemischen Indikatorsystemen, die auf Multispot-Objektträger fixierte Zellen angewandt werden.

Diese Doppelmarkierungsmethode hat einige Vorteile gegenüber vergleichbaren Doppelmarkierungs-Techniken. Sowohl beide Markierungen als auch die Morphologie der Zellen sind lichtmikroskopisch gleichzeitig beurteilbar. Dies kann die Kombination zweier Immunfluoreszenzmarkierungen (Parks et al, 1983; Anderson et al, 1986; Rabinovitch et al, 1986) nicht bieten, weil die zwei Marker mit UV-Licht zum Fluoreszieren angeregt werden, jedoch jeder Marker verschiedene Lichtbedingungen fordert. Ein weiterer Vorteil unserer Methode ist die Möglichkeit, die Präparate über längere Zeit für Vergleiche aufzubewahren. Im Gegensatz dazu nimmt die Markierung der Doppelimmunfluoreszenz unter Beleuchtung rasch ab.

Auch andere Methoden, welche zur Doppelmarkierung, Immunfluoreszenz und ein anderes Nachweissystem wie Autoradiographie (McDevitt et al, 1986; Smithyman, 1977) oder Zytochemie (Dal Canto et al, 1975) verwenden, haben keine wesentlichen Verbesserungen gebracht.

Eine Kombination von Antikörpern, die mit unterschiedlichen Enzymen markiert sind, kann für die gleichzeitige Markierung verschiedener Zellpopulationen oder für ganze Gewebeteile diese Forderungen erfüllen (Hoffmann-Fezer et al, 1982; Feller und Parwaresch, 1983; Boorsma, 1984; Van Rooijen, 1984a,b,c). Das methodische Problem, zwei verschiedene Antigene auf der gleichen Zelle zu identifizieren, bleibt allerdings auch bei dieser Methode bestehen.

In diesem Fall werden die enzymkatalysierten, verschiedenfarbigen Niederschläge zu undeutlichen Farbmischungen führen. Das ist besonders dann problematisch, wenn die für histologische Präparate hervorragende doppelimmunhistochemische Methode auf Einzelzellen angewandt wird (Kapitel C 1.2.5 und Abb. 8). Gerade bei der Darstellung zweier verschiedener Antigene auf derselben Zelle, ist die neue Doppelmarkierungsmethode, durch den starken Kontrast zwischen der Silberkornschwärzung in der Fotoemulsion und den enzymkatalysierten roten Niederschlag an der Zellmembran, besonders geeignet. Da die resultierenden Markierungen über der Zelle in verschiedenen Ebenen zur Geltung kommen, besteht die zusätzliche Möglichkeit durch Änderung der Schärfeneinstellung im Mikroskop den jeweils anderen Marker "abzublenden". Damit kann auch eine ganz schwache Markierung erkannt werden, weil sie nicht von der anderen verdeckt wird.

Dadurch, daß diese neue Kombination für die Doppelmarkierung der Zellen auf Multispot-Objektträger angewandt wurde, wird im Vergleich mit Zytozentrifugenpräparaten, sowohl die Zellmorphologie, als auch der Erhalt der Zellantigene besser gewährleistet. Das führt zu einer Steigerung der Empfindlichkeit im Antigennachweis und einer besseren Trennung zwischen dem Zytoplasma- und Membrananantigennachweis.

Da der Autoradiographiefilm auf Grund der wasserabstoßenden Polysiloxanschicht nicht auf dem Objektträger haften konnte, wurde die original Multispot-Objektträger Methode von Bross et al (1978) für die Doppelmarkierung erweitert. Hierfür wird die wasserabstoßende Schicht durch eine selbstgefertigte Plastikfolie ersetzt. Nach der AEC-Reaktion wird sie abgezogen, so daß der aufgelegte Film fest auf dem Glas haften kann. Die vielen Reaktionsfelder vereinfachen die Durchführung der Experimente, indem auf jedem Feld andere Zellen oder Antikörper angesetzt werden können, so daß alle Inkubationen und Zellwaschungen auf

demselben Objektträger stattfinden. Damit sind völlig einheitliche Bedingungen vorhanden. Zusätzlich ist der Verbrauch an Antikörpern auf Grund der höheren Sensitivität und geringeren Zellmenge vergleichsweise minimal.

Die bisherigen immunautoradiographischen Methoden wurden mit Jod-markierten Antiseren durchgeführt (Bankhurst und Warner, 1971; Dwyer und Mackay, 1972; Nossal et al, 1972; Thiel et al, 1975).

Die in dieser Arbeit angewandte Autoradiographie nutzte eine Technik für Tritium-Kopplung von Antikörpern (Kummer, 1981), die gegenüber der Jod 125 Immunautoradiographie den Vorzug einer Lokalisierung der Markierung in Form einer Silberkornschwärzung in der Photoemulsion unmittelbar über den markierten Zellen hat und die nicht mit einer weiten Streuung einhergeht. Um eine hohe Sensitivität zu erreichen, erfolgte eine, gegenüber der bisherigen Standardmarkierung (Kummer et al, 1981; Spezifische Aktivität 400Ci/mmol) höhere Kopplung des Antikörpers (spezifische Aktivität 800Ci/mmol). Damit wurde die im direkten Test fehlende Verstärkerfunktion des "Sandwich-Antikörpers" kompensiert.

Es konnte gezeigt werden, daß der Antikörper trotz seiner höheren Kopplung in seiner funktionellen Aktivität nicht nachweisbar eingeschränkt wird. Weiterhin ist die Halbwertszeit des Tritium (12 Jahre) im Vergleich zu Jod (60 Tage) viel länger und hat zudem ein geringeres biologisches Strahlenrisiko. Da die Quantifizierbarkeit des Tritiums in der Autoradiographie nicht genug erforscht war, stellte sich die Frage ob die neue Methode auch die Quantifizierung der ^3H -markierten Antigene ermöglicht.

Bei Zytocentrifugenpräparaten und ^3H -markierten Con-A waren die quantitativen Messungen unbefriedigend (Dörmer und Jäger, 1983). Es war daher zu prüfen, ob bessere Voraussetzungen gegeben sind für die Quantifizierung der markierten Antigene durch Verwendung der Multispot-Objekt-

träger, die den Vergleich mit mehreren Kontrollen auf dem gleichen Objektträger erlauben.

Damit waren alle Bedingungen, wie Expositionszeit, Entwicklung, Fixierung, Gegenfärbung u.a., die das Ergebnis beim Vergleich mehrerer Objektträger beeinflussen könnten, gleich. Als Referenz dienten AKR-Zellen (P), die homozygot für Thy-1.1 sind und heterozygote AKR/BALB Zellen (F1), mit 50% Thy-1.1 und 50% Thy-1.2.

Die photometrischen Messungen zeigten ein P:F1 Verhältnis von 1,4:1, was mit den RIA-Werten, die 2:1 waren (R.Schuh, persönliche Mitteilung), nicht übereinstimmt. Da sowohl die Zellen als auch alle Ansätze gleich waren und auf demselben Objektträger durchgeführt wurden, ist es schwer, diese Ergebnisse nur mit der Selbstabsorption des Tritiums zu erklären.

Die Unterschiede zwischen RIA und Autoradiographie könnten, wenigstens teilweise, durch die Art der Messungen entstehen. Während RIA eine summarische Messung für die ganze Zellpopulation ergibt, bestimmt die Autoradiographie Einzelzellwerte.

Beim zweiten Versuch wurden die Thy-1 Antigendichten zwischen Thymus und Lymphknoten-Zellen verglichen. Das Verhältnis betrug 2,3:1 bei den autoradiographischen Messungen (Tabelle 4), während die FACS-Versuche eine 2,2:1 Relation zeigten (Ledbetter et al, 1980).

Obwohl die FACS-Untersuchungen mit anderen Mäusestämmen gemacht wurden, stimmen die Werte mit unseren Ergebnissen überein. Von diesen Ergebnissen ausgehend, scheint die ^3H -Autoradiographie für quantitativen Messungen vielversprechend zu sein. Die Unstimmigkeiten mit den RIA-Werten müssen durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

2. Zellanalyse bei der Maus

Mit der neuen Doppelmarkierungsmethode wurde die Lympho-

zytenanalyse bei der Maus durchgeführt. Um die Zellen und Zellsubpopulationen besser charakterisieren und klassifizieren zu können, wurden verschiedene monoklonale Antikörper kombiniert angewandt. Unsere Ergebnisse zeigten, daß sowohl im Thymus als auch in der Peripherie die meisten Thy-1⁺-Zellen auch durch anti-Lyt-1 markiert wurden. Das stimmt überein mit Befunden der FACS-Analyse (Ledbetter und Herzenberg, 1979), die das Lyt-1 Antigen auf mehr Zellen nachwiesen als ursprünglich (Cantor und Boyse, 1977) beschrieben wurde.

Zusätzlich konnten zwei kleine Subpopulationen beobachtet werden, welche entweder nur Thy-1 oder nur Lyt-1 exprimieren. Im Thymus konnten wir 6+1% Thy-1 Lyt-1 Zellen nachweisen und mit der Multiparameter-Analyse zeigen, daß sie Lyt-2⁻L3T4⁻ sind. Ca. 10% dieser Zellen befinden sich in der S-Phase des Zellzyklus, welcher darauf hinweisen könnte, daß diese Zellpopulation die T-Zell-Vorläufer darstellen. Diese wiederum entwickeln sich aus Thy-1⁻Prothymozyten (Kadish und Basch, 1976; Abramson et al, 1977). Daß Prothymozyten Thy-1⁻sind, wurde durch Transplantationsversuche bestätigt. Bei der Transplantation von anti-Thy-1 behandeltem Knochenmark in letal bestrahlte Mäuse (Boersma et al, 1981) werden im Vergleich zu normaler unbehandelter Knochenmarkübertragung keine Unterschiede in der Thymusrepopulierung gefunden (Boersma et al, 1981).

Eine ähnliche Thy-1⁺Lyt⁻Population wurde von van Ewijk et al (1981) in der subkapsulären Zone von Cortison-behandelten Thymi beschrieben. Im Gegensatz dazu findet Scollay (1983) 2-4% dieser Zellen in der Cortison-sensitiven Population, was vermutlich von methodischen Unterschieden der Cortison-Behandlung verursacht wurde. Beide Autoren beschreiben die gleiche Lokalisierung im äußeren Cortex, wo sich nach der Einweg-Theorie die Thymozytenvorläufer befinden sollen.

Ein weiterer Befund von Scollay (1982) und Raedler (1982), nach dem die überwiegende Zellpopulation am 16. Tag der fötalen Entwicklung aus $\text{Thy-1}^+\text{Lyt}^-$ Zellen besteht, festigt die Hypothese, daß diese Zellen Thymozytenvorläufer darstellen.

Interessanterweise wurden 3% dieser $\text{Thy-1}^+\text{Lyt-1}^-$ Zellen in den Lymphknoten und 1% in der Milz nachgewiesen. Da diese Zellen das Thy-1 -Antigen sehr stark ausprägen, das als Differentierungsmarker in hoher Dichte besonders auf unreifen Zellen exprimiert wird (Fathman et al, 1975; Ledbetter et al, 1980), könnten sie unreife T-Lymphozyten sein, die die thymische Selektion umgingen. Andererseits wäre es möglich, daß diese Zellen eine thymusunabhängige Population darstellen, die im Notfall als T-Zellreserve dient. Für die Thymusunabhängigkeit dieser Zellen spricht, daß auch bei thymektomierten Neugeborenen, ATX^a- und Nudemäusen Thy-1^+ Zellen gefunden werden (6-7%; Raff u. Wortis, 1970; Cobbold, 1984). De Talence et al. (1986) beschreiben autoreaktive T-Zellen in der Milz normaler Mäuse, die $\text{Thy-1}^+\text{Lyt-1}^-$ sind. Durch die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen Thy-1 , Lyt-1 , Lyt-2 und L3T4 plus Komplement konnten sie angereichert werden. Sie exprimieren schwach Thy-1 und nicht Lyt-1 , Lyt-2 und L3T4 . Nach Con-A-Stimulation werden sie autoreaktiv und differenzieren sich in $\text{Thy-1}^+\text{Lyt-1}^+\text{Lyt-2}^-\text{L3T4}^+$ Zellen.

Der Frage, ob die von uns beschriebene Zellsubpopulation und diese autoreaktiven T-Lymphozyten dieselbe Zellpopulation repräsentieren, muß durch weitere Untersuchungen nachgegangen werden.

Im Gegensatz zum Thy-1 -Antigen, dessen Dichte während der Ausreifung abnimmt, wird die Ausprägung des Lyt-1 -

^a Adulte thymektomierte, bestrahlte und mit Knochenmark rekonstituierte Mäuse

Antigens um so stärker desto reifer die Zellen werden (Ledbetter et al, 1980). Da im Thymus alle Reifungsstufen der T-Zellen vorhanden sind, ist die Ausprägung des Lyt-1 Antigens entsprechend unterschiedlich, von sehr stark bis schwach. Weiterhin gibt es Thymozyten, die Thy-1.1⁻ Lyt-1⁺ sind. Diese Zellen sind vermehrt in der Milz mit 12±2% und im Lymphknoten mit 16±1,6% vertreten, was auf ihre höhere Reifungsstufe hindeutet. Bei diesen Zellen ist entweder das Thy-1.1-Antigen verloren gegangen oder in so niedriger Antigendichte exprimiert, daß es mit herkömmlichen Methoden nicht mehr nachweisbar ist. Manohar (1982) und Hayakawa (1983) zeigten, daß ein sehr geringer Anteil der IgM⁺-Zellen der Milz ebenfalls Lyt-1 ausprägen. Allerdings ist dieser Anteil viel zu gering, um den Befund von 10% Thy-1.1⁻Lyt-1⁺-Zellen erklären zu können. Auch funktionelle Untersuchungen (Sato, 1976; Mattes et al, 1979; Abeshira et al, 1981) zeigten, daß eine Zellpopulation in der Milz kein oder sehr wenig Thy-1-Antigen exprimiert. Diese Zellpopulation kann nicht mit anti-Thy-1 und Komplement lysiert werden, und sie umfaßt bei AKR-Mäusen eine größere Zahl als bei CBA Mäusen. Erst wenn diese Zellen in vitro mit BALB/c Milzzellen co-kultiviert werden, prägen sie das Thy-1.1-Antigen aus und entwickeln sich in cytotoxische Effektorzellen. Eigene Untersuchungen bei AKR Mäusen zeigten, daß es sich tatsächlich um eine Zellpopulation handelt, die zwar Thy-1.1⁻ ist, aber gleichzeitig durch die Ausprägung des pan T Antikörpers, Lyt-1, der T-Zellreihe angehört. Zusätzlich wurden zum erstenmal solche Zellen auch in Lymphknoten charakterisiert.

Auch aus Doppelmarkierungsuntersuchungen mit anti-Thy-1 und T-Subpopulationsmarkern wurden interessante Ergebnisse mit ungewöhnlichen Markerverteilungen auf einen kleinen Prozentsatz von Lymphozyten gewonnen. So konnten Lyt-2⁺Thy-1⁻-Lymphozyten gefunden werden, die bisher nur bei den Intraepithelialen Lymphozyten (IEL) im Dünndarm von Menschen (OKT8⁺Leu-1⁻) und Mäusen beschrieben

wurden (Ernst et al, 1985; Petit et al, 1985; Klein, 1986). IEL bestehen größtenteils aus aktivierten zytotoxischen Zellen, die das CT-1-Antigen ausdrücken. Über die Ontogenese dieser Zellen ist kaum etwas bekannt, und die Entwicklung sowie ihre Herkunft ist umstritten.

Es wurde vermutet, daß diese Zellen thymusunabhängig sind (Mayrhofer, 1980). Die Befunde von Klein (1986), die auch bei Nudemäusen Thy-1⁻ Lyt-2⁺-Zellen nachweisen konnten, sprechen für diese Theorie. Diese thymusunabhängigen Zellen würden ihre lytische Aktivität im Intestinalepithel unter dem Einfluß von Lymphokinen wie z. B. IL-2 erwerben (Ernst et al, 1985).

Andererseits könnten die Thy-1⁻ Lyt-2⁺-Zellen auch periphere CTL repräsentieren, die das Thy-1-Antigen verloren haben. Damit könnten sie den reiferen Lymphozyten zugeordnet werden.

Unsere Ergebnisse unterstützen die letztgenannte Theorie. Sie zeigen, daß die Thy-1⁻ Lyt-2⁺-Zellen nicht nur auf das Intestinalepithel begrenzt sind. Wenn auch nur in einem sehr kleinen Prozentsatz, so sind sie sowohl in der Milz als auch im Lymphknoten vertreten. Zusätzlich sind auch im Thymus 1% der Zellen Thy-1⁻ Lyt-2⁺. Darüberhinaus ist anzunehmen, daß die Thy-1⁻ Lyt-2⁺-Lymphozyten eine Reifungsstufe der thymusgeprägten Zellen sind.

Mit der Doppelmarkierungsmethode läßt sich in Lymphknoten ein Teil der Zellen, 4-9%, mit anti-Lyt-2 und anti-L3T4 gleichzeitig markieren. Das Ergebnis ist überraschend, weil alle vorhandenen Studien über die Lyt-2 und L3T4-Antigenverteilung (Dialynas et al, 1983a; 1983b; Pierres et al, 1984) beschreiben, daß sie in der Peripherie von einander sich ausschließenden Subpopulationen ausgeprägt werden. Unsere Ergebnisse zeigten, daß die Zahl der nachgewiesenen Lyt-2⁺- und L3T4⁺-Zellen in Lymphknoten kleiner war als die theoretisch erwartete Summe von Lyt-2⁺- und L3T4⁺-Zellen. Die rechnerische Summe von

Lyt-2⁺- (15_±0,2%) und L3T4 (38_±1,5%)-Zellen im Lymphknoten sollte 53_±1,5% ergeben, aber tatsächlich betrug sie 47_±2,1%. Diese Resultate bedeuten, daß ein Teil der Lymphozyten Lyt-2⁺L3T4⁺ sind, was mit der Doppelmarkierung auch direkt nachgewiesen werden konnte. In Lymphknoten prägen 6 _± 2% der Lymphozyten das Lyt-2- und L3T4-Antigen gleichzeitig aus. Bei Menschen wurde eine entsprechende Subpopulation CD4⁺CD8⁺-Zellen im normalen Blut nachgewiesen (Blue et al, 1986). Diese Befunde bestärken die Hypothese der Einweg-intrathymischen T-Zell-Differenzierung, nach der sich die reifen Lyt-2⁺L3T4⁻ und Lyt-2⁻L3T4⁺-Lymphozyten aus den Lyt-2⁺L3T4⁺-Thymozyten entwickeln. Während der Ausreifung, die einen kontinuierlichen Prozeß darstellt, werden die differenzierten Lyt-2⁺L3T4⁻ und Lyt-2⁻L3T4⁺-Lymphozyten in die Peripherie entlassen. Denkbar ist, daß bei der Ausschleusung auch eine entsprechende Anzahl weniger differenzierter Zellen einbezogen werden.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß kein Marker für sich allein genommen eine klare Definition und Trennung von Lymphozytensubpopulationen erbringt. Da viele Antigene in einem fließenden Übergang ausgeprägt werden, muß hierfür die Kombination verschiedener Marker Verwendung finden. Zusätzlich müssen diese phänotypischen Charakteristiken noch mit histologischen Beobachtungen und funktionellen Eigenschaften korreliert werden, um eine genauere Vorstellung über das Lymphozytensystem zu erhalten.

3. Zellanalyse bei Graft-versus-Host-Reaktion

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde versucht, die Markeranalyse mit der Funktion der Lymphozyten zu korrelieren. Hierfür wurden reife AKR T-Lymphozyten in eine letal bestrahlte C57BL/6-Maus transplantiert.

Dadurch, daß sich diese beiden Mäusestämme im H-2-Lokus unterscheiden (H-2b versus H-2k), werden die Spenderlymphozyten durch die Empfängerantigene stimuliert und die akute GvH-Krankheit ausgelöst. Da die GvH-Reaktion überwiegend durch T-Lymphozyten getragen ist, wurden mit Hilfe des anti-Thy-1.1-Antikörpers, der ausschließlich von den Spenderlymphozyten (AKR) ausgeprägt wird, diese Zellen im Empfänger verfolgt. Somit bietet unsere Doppelmarkierungsmethode modellhafte Ergebnisse für eine Spender-T-Zellbestimmung, wie sie bei anderen Spezies wegen fehlendem T-Zellpolymorphismus unmöglich ist. Zugleich wurden mittels Doppelmarkierungsmethode mit anderen exprimierten T-Antigene charakterisiert. Damit wurden T-Zellsubpopulationen definiert, welche als an der Auslösung der GvH-Krankheit beteiligt betrachtet werden können.

Da die Experimente mit ^{51}Cr -gekoppelten syngen (Taub und Lance, 1971) und allogenen (Silobrcic et al, 1976) Spenderzellen zeigten, daß die transplantierten Zellen größtenteils in der Milz gefunden werden, richtete sich unsere Zellanalyse auf die Empfänger milz. Dementsprechend wurden in der Milz kurz nach der Transplantation Spender-Thy-1.1⁺-Zellen nachgewiesen, die in der allogenen Kombination sehr schnell anstiegen. Schon am vierten Tag nach Transplantation erreichten sie ihre maximale Anzahl, was mit Literaturergebnissen übereinstimmt (Vitale et al, 1976; Wolters und Benner, 1978). Das Absinken dieser Anzahl am sechsten Tag, verbunden mit dem Tod des Versuchstieres, korreliert mit den ^{51}Cr -Messungen von Silobrcic et al, 1976 und zeigt deutlich, daß es sich um eine H-2 bedingte Stimulation handelt. Zur syngen Kontrolle, bei der sich die Spender-T-Lymphozyten gleichmäßiger und langsamer entwickeln, wurde zusätzlich eine kongene Kontrolle durchgeführt, um die Spender Thy-1.1⁺-Zellen verfolgen zu können. Auch hier ist die Entwicklung der Spenderlymphozyten ähnlich wie bei syngen transplantierten Mäusen. Es ist bekannt, daß bei der Regeneration letal bestrahlter

Mäuse durch syngenes Knochenmark oder fötale Leber zuerst die B-Lymphozyten nachweisbar werden. Erst später, drei Wochen nach der Transplantation, entwickeln sich die T-Lymphozyten (Roizing et al, 1978; Viktora et al, 1978 und Kraal et al, 1979).

Von den Empfänger Thy-1.2⁺-Lymphozyten sind in allogenen transplantierten Mäusen am vierten Tag nur noch 3% und am sechsten Tag gar keine mehr zu finden. Im Gegensatz dazu sind die Empfänger-Thy-1.2⁺-Zellen bei der Kontrollgruppe auch noch 14 Tage nach der Transplantation vorhanden. Dies bedeutet, daß die Empfängerzellen bei H-2 inkompatiblen Transplantationen noch zusätzlich durch Spenderzellen vernichtet werden.

Um die gesamte Spender- und Empfänger-T-Zellpopulation zu erfassen, wurde eine Doppelmarkierung mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1 durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, daß die Thy-1.1⁺ Lyt-1⁻-Subpopulation am vierten Tag, wenn die gesamten Spender-T-Zellen stark proliferieren, ansteigt.

Dieses Ergebnis ist ein weiterer indirekter Hinweis darauf, daß die Thy-1.1⁺ Lyt-1⁻-Zellen, die auch in normalen Lymphknoten und in der Milz nachgewiesen wurden, Vorläuferzellen darstellen. Nach starker Stimulation werden sie aktiviert, um reife T-Lymphozyten zu produzieren. Der Anteil der Lyt-1⁺-Zellen, die gleichzeitig Thy-1.1⁻ und Thy-1.2⁻ sind, ist bei allogenen transplantierten Mäusen niedriger als bei normalen Milzzellen. Dies wurde auch bei beiden Kontrollgruppen beobachtet. Die Tatsache, daß die transplantierten Zellen sich in der Entwicklung befinden und wahrscheinlich zum größten Teil noch unreif sind, könnte die niedrigere Zahl der reiferen Thy-1⁻ Lyt-1⁺-Zellen erklären. Weiterhin könnten die Thy-1⁻ Lyt-1⁺-Zellen als reifere Effektorzellen schon aus der Milz ausgewandert sein. Es ist schon lange bekannt, daß die T-Lymphozyten für die GvH-Krankheit verantwortlich sind (Simonsen, 1962; Hildemann, 1964). Wenn die

reifen Spender-T-Lymphozyten entweder mit absorbiertem, T-zellspezifischem Antilymphozytenserum (ALS; Rodt et al, 1972; Trentin und Judd, 1973; Müller-Ruchholtz et al, 1976) oder monoklonalen anti-Thy-1-Antikörpern und Komplement in vitro (Vallera et al, 1981; Onoe et al, 1982; OKunewick, 1982; Thierfelder, 1982) oder in vivo (Cobbold, 1984; Thierfelder et al, 1985) eliminiert werden, wird die akute GvH-Krankheit vermieden. Jedoch ist die Frage, welche T-Subpopulationen die GvHR verursachen, noch umstritten. Die Verfügbarkeit der anti-Lyt-Antikörper ermöglichte dieser Frage nachzugehen. Die Spenderzellen wurden entweder mit Hilfe der FACS separiert oder in vitro mit den entsprechenden Antikörpern und Komplement behandelt und dann transplantiert (Loveland et al, 1981; Vallera et al, 1982; Korngold und Sprent, 1985).

Die Ergebnisse von Vallera et al (1982) zeigten, daß die in vitro Behandlung von Spenderzellen mit anti-Lyt-1 und Komplement die Empfänger vor letaler GvHR schützen kann. Im Gegensatz dazu sind die anti-Lyt-2-Antikörper unwirksam. Ähnlich sind die Befunde von Loveland et al (1981). Thymektomierte, bestrahlte und rekonstituierte (ATX) Mäuse wurden mit anti-Lyt-1 oder anti-Lyt-2 depletierten Lymphozyten transplantiert. Nur die mit anti-Lyt-2 depletierten Lymphozyten transplantierten Mäuse können die allogenen Hauttransplantate abstoßen.

Da die Lyt-1-Antigene von den meisten T-Zellen exprimiert werden, könnten die Unterschiede zwischen den anti-Lyt-2- und anti-Lyt-1-behandelten Lymphozyten einfach dadurch entstanden sein, daß der anti-Lyt-1-Antikörper mehr T-Zellen als anti-Lyt-2 entfernt. Dem widersprechen die Ergebnisse von Korngold und Sprent (1985). Sie finden, daß die $L3T4^+Lyt-2^-$ -Zellen für die Auslösung der akuten GvHR zwischen H-2-inkompatiblen Mäusen die entscheidende Zellpopulation darstellt. Eigene Untersuchungen zeigen, daß nach der Transplantation von unseparierten Lymphozyten sowohl die $Lyt-2^+$ als auch die $Lyt-2^-$ -Spenderzellen proliferieren und eine akute GvHR verursachen.

Am vierten Tag nach der Transplantation, als die Thy-1.1⁺-Lymphozyten sehr stark anstiegen, waren die Lyt-2⁺-Zellen die überwiegende Zellpopulation geworden. Das Verhältnis dieser Lyt-2⁺-Zellen zu den Thy-1.1-⁺Lyt-2⁻-Lymphozyten war mit 2,5:1, im Gegensatz zum normalen Verhältnis von 1:2 bei unbehandelten Tieren außergewöhnlich hoch. Im Vergleich dazu entwickelten sich bei den syngeneten Kontrolltransplantationen beide Subpopulationen (Lyt-2⁺ und Lyt-2⁻) parallel, und ihre Relation betrug immer 1:2. Darüberhinaus ist anzunehmen, daß die Lyt-2⁺-Zellen bei der akuten GvHR eine wichtige Effektorrolle spielen. Da die separierten Lyt-2⁺-Zellen allein keine GvHR verursachen (Loveland et al, 1981; Valera et al, 1982), ist es möglich, daß sie sich nur bei Anwesenheit der Lyt-2⁻-Zellen entwickeln können.

E ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine neue Doppelmarkierungsmethode entwickelt, welche die simultane Darstellung zweier Antigene durch markierte Antikörper auf der gleichen Zelle ermöglicht. Unser Ansatz für die Doppelmarkierung basiert auf dem kombinierten Einsatz von Immunzytochemie und ^3H -Immunautoradiographie an Einzelzellen. Die entscheidenden Vorteile gegenüber anderen Doppelmarkierungsmethoden sind die gleichzeitige Darstellung von zwei verschiedenen Antigenen auf derselben Zelle und ihre mühelose Unterscheidung durch den starken Kontrast zwischen der Silberkornschwärzung und dem enzymkatalysierten roten Niederschlag sowie ihre in unterschiedlichen Schichten (Photoemulsions bzw. Zellebene) dargestellten Markierung, was durch Änderung der Schärfeneinstellung im Mikroskop eine Ausblendung der jeweils anderen Markierung erlaubt. Ein Vorzug der Methode ist auch, daß die Zellmorphologie gut erkennbar bleibt und somit als weiteres Klassifizierungsmerkmal genutzt werden kann.

Dadurch, daß diese neue Kombination für die Doppelmarkierung der Zellen auf Multispot-Objektträgern angewandt wurde, werden im Vergleich zu Zytozentrifugenpräparaten die Zellantigene besser erhalten, was zu einer hohen Empfindlichkeit des Antigennachweises führt.

Der Einsatz von ^3H -markierten Antikörpern hat gegenüber der ^{125}Jod -Immunautoradiographie folgende Vorzüge:

- a) Lokalisierung der Silberkornschwärzung in der Photoemulsion ohne weite Streuung,
- b) minimale Einschränkung der funktionellen Aktivität der Antikörper, d.h. exzellente Rausch-Signal-Werte,
- c) lange Halbwertszeit des markierten Reagens und
- d) minimiertes biologisches Strahlenrisiko.

Da die Multispot-Objektträger gegenüber Zytozentrifugenpräparaten den Vorzug haben, die Zellen mit mehreren Kontrollen auf demselben Objektträger vergleichen zu können, wurde die Quantifizierbarkeit der markierten Antigene untersucht. Mittels photometrischer Messungen konnte gezeigt werden, daß die ^3H -Autoradiographie auf Multispot-Objektträgern auch für quantitative Messungen vielversprechend ist, was aber noch weiterer Untersuchungen bedarf.

Durch die gleichzeitige Verwendung monoklonaler Antikörper, die mit Enzym oder radioaktivem β -Strahler markiert sind, kann eine wesentlich verbesserte Klassifizierung von Lymphozyten anhand ihrer immunologischen Phänotypen erreicht werden. Mit der neuen Doppelmarkierungsmethode wurde die Immunphänotypisierung von Lymphozyten der Maus durchgeführt. Um die Zellen und Zellsubpopulationen charakterisieren zu können, wurden monoklonale Antikörper gegen Thy-1, Lyt-1, Lyt-2 und L3T4 kombiniert angewandt. Die Doppelmarkierung der Lymphozyten mit anti-Thy-1.1 und anti-Lyt-1 zeigte, daß die zwei Antikörper etwas verschiedene Zellpopulationen erkennen. Es wurden in Mäusemilz und Lymphknoten Zellpopulationen gefunden, die Thy-1.1⁺ Lyt-1⁻ sind. Diese können entweder unreife T-Lymphozyten oder autoreaktive Zellen sein. Zum ersten Mal wurden Thy-1.1⁻Lyt-1⁺ Zellen in Mäuselymphknoten charakterisiert. Dabei zeigte sich die Doppelmarkierung für die Bestimmung kleiner Zellpopulationen als besonders geeignet.

Auch aus Doppelmarkierungsuntersuchungen mit anti-Thy-1 und T-Subpopulationsmarkern anti-Lyt-2 und anti-L3T4 wurden Ergebnisse mit ungewöhnlichen Markerverteilungen auf einem kleinen Prozentsatz von Lymphozyten gewonnen. So wurden Thy-1⁻ Lyt-2⁺ Zellen, welche bisher nur im Intestinalepithel nachgewiesen wurden, auch in der Milz und den Lymphknoten gefunden. Zum ersten Mal wurden Lyt-2⁺ L3T4⁺ Lymphozyten, welche für die Lymphozytenontogenese von Bedeutung sind, in peripheren lymphatischen Kompartimenten nachgewiesen. In Lymphknoten prägen $6 \pm 2\%$ der Lymphozyten das Lyt-2 und L3T4 Antigen gleichzeitig aus.

Diese Lymphozytenanalyse zeigte, daß kein Marker für sich allein genommen eine klare Definition und Trennung von Lymphozytensubpopulationen darstellt. Erst die Kombination verschiedener Marker korreliert mit funktionellen Eigenschaften, erbringt eine genauere Vorstellung über das Lymphozytensystem. Hierfür wurde die Analyse der normalen Zelldifferenzierung nach syngener Knochenmarktransplantation und die Untersuchungen der gestörten Zelldifferenzierung bei GvH herangezogen. Mit der Doppelmarkierung wurde das Verhalten sowie die Verteilung der Spenderlymphozyten im Empfänger beobachtet. Bei der akuten GvH-Reaktion wurde eine Stimulation der Lyt-2^+ - und Lyt-2^- -Subpopulationen gefunden, wobei eine Inversion des $\text{Lyt-2}^+:\text{Lyt-2}^-$ -Verhältnisses der Spender-T-Lymphozyten erkennbar wurde. Ein Vorzug in der Anwendung der hier beschriebenen Doppelmarkierungsmethode auf das GvH-Modell der Maus war auch die Abgrenzungsmöglichkeit des Spender-vom Empfänger-T-Zellphänotyps. Dies stellt ein modellhaftes Ergebnis dar für eine Spender-T-Zellbestimmung, wie sie bei anderen Spezies wegen fehlendem T-Zellpolymorphismus unmöglich ist.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abeshira O., A. Edwards und E. Simpson, 1981
Functional and binding activity of monoclonal anti-Thy-1
antibodies: evidence for different expression of the two
alleles
Eur.J.Immunol., 11, 275-281
- Abramson S., R.G. Miller und R.A. Phillips, 1977
The identification in adult bone marrow of pluripotent and
restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems
J.Exp Med., 145, 1567-1579
- Anderson K.C., J.A. Roach, J.F. Daley, S.F. Schlossman und
L.M. Nadler, 1986
Dual fluorochrome analysis of human B lymphocytes:
phenotypic examination of resting, anti-immunoglobulin
stimulated, and in vivo activated B cells
J.Immunol., 136, 3612-3618
- Bankhurst A.D. und N.L. Warner, 1971
Surface immunoglobulins on mouse lymphoid cells
J.Immunol., 107, 368-373
- Barclay, A.N., M. Letarte-Muirhead und A.F. Williams, 1975
Purification of the Thy-1 molecule from rat brain
Biochem.J., 151, 699-706
- Blue M.L., J.F. Daley, H. Levine und S.F. Schlossman, 1986
Lectin activation induces T4, T8 coexpression on peripheral
blood T cells
In: Leukocyte Typing II, Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York, Vol. 1 Human T Lymphocytes, eds. E.L.
Reinherz, B.F. Haynes, L.M. Nadler und I.D. Bernstein, pp
89-99

Boersma W., I. Betel, R. Daculsi und G. Van der Westen, 1981
Post-irradiation thymocyte regeneration after bone marrow
transplantation. I. Regeneration and quantification of
thymocyte progenitor cells in the bone marrow
Cell Tissue Kinet., 14, 179-196

Boorsma D.M., 1984

Direct immunoenzyme double staining. Applicable for
monoclonal antibodies
Histochem., 80, 103-106

Boyse E.Z., M. Miyazawa, T. Aoki und L.J. Old, 1968
Ly-A and Ly-B; Two systems of lymphocyte isoantigens in the
mouse
Proc.R.Soc.Lond., 170, 175-193

Boyse E.A., K. Itakura, E. Stockert, C.A. Iritani und M.
Miura, 1971

Ly-C: A third locus specifying alloantigens expressed only
on thymocytes and lymphocytes
Transplantation, 11, 351-353

Bross K.J., G.A. Pangalis, C.G. Staatz und K.G. Blume, 1978
Demonstration of cell surface antigens and their antibodies
by the peroxidase-antiperoxidase method
Transplantation, 25, 331-334

Bryant B.J., 1972

Renewal and fate in the mammalian thymus: Mechanisms and
inferences of thymocytokinetics
Eur.J.Immunol., 2, 38-45

Burnet F.M., 1968

Evolution of the immune process in vertebrates
Nature, 218, 426-430

Campbell D.G., J. Gagnon, K.B.M. Reid, A.F. Williams, 1981
Rat brain Thy-1 glycoprotein. The amino acid sequence,
disulphide bonds and an unusual hydrophobic region
Biochem.J., 195, 15-30

Cantor H. and R. Asofsky, 1972

Synergy among lymphoid cells mediating the
graft-versus-host response. III. Evidence for interaction
between two types of thymus-derived cells
J.Exp.Med., 135, 764-779

Cantor H. und E.A. Boyse, 1977

Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular
differentiation
Immunol.Rev., 33, 105-124

Cobbold S.P., A. Jayasuriya, A. Nash, T.D. Prospero und H.
Waldmann, 1984

Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell
subsets in vivo
Nature, 312, 548-551

Dal Canto M.C., N.R. Blum und A.B. Johnson, 1975

Immunofluorescence-horseradish peroxidase combined staining
technique for demonstrating both immunoglobulin class and
antigen-binding specificity of cellular antibody. Studies
on experimental allergic neuritis and encephalomyelitis
J.Histochem.Cytochem., 23, 452-457

Dallman M.J., M.L. Thomas und J.R. Green, 1984

MRC OX-19: A monoclonal antibody that labels rat T
lymphocytes and augments in vitro proliferative responses
Eur.J.Immunol., 14, 260-267

De Talance A., D. Regnier, S. Spinella, J. Morisset und H.
Seman, 1986

Origin of autoreactive T helper cells. I. Characterization
of Thy-1⁺Lyt⁻L3T4⁻ precursors in the spleen of normal
mice
J.Immunol., 137, 1101-1108

Dialynas D.P., Z.S. Quan, K.A. Wall, A. Pierres, J. Quintans, M.R. Loken, M. Pierres und F.W. Fitch, 1983
Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule
J.Immunol., 131, 2445-2451

Dialynas D.P., D.B. Wilde, P. Marrack, A. Pierres, K.A. Wall, W. Havran, G. Otten, M.R. Loken, M. Pierres, J. Kappler und F.W. Fitch, 1983
Characterization of the murine antigenic determinant designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: Expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity
Immunol.Rev., 74, 29-56

Dörmer P., W. Brinkmann, A. Stieber und W. Stich, 1966
Automatische Silberkornzählung in der Einzelzell-Autoradiographie. Eine neue photometrische Methode für die quantitative Autoradiographie
Klin.Wschr., 44, 477-482

Dörmer P. und G. Jäger, 1983
Tritium autoradiography of cell surface in smear preparations
J.Histochem.Cytochem., 31, 799-802

Douglas T.C., 1972
Occurrence of a theta-like antigen in rats
J.Exp.Med., 136, 1054-1062

Durda P.J. und P.D. Gottlieb, 1978
Sequential precipitation of mouse thymocyte extracts with anti-Lyt-2 and anti-Lyt-3 sera. I. Lyt-2.1 and Lyt-3.1 antigenic determinants reside on separable molecular species
J.Immunol., 121, 983-989

Durda P.J., C. Shapiro und P.D. Gottlieb, 1978

Partial molecular characterization of the Ly-1 alloantigen
on mouse thymocytes

J.Immunol., 120, 53-57

Dwyer J.M. und I.R. MacKay, 1972

Validation of autoradiography for recognition of
antigen-binding lymphocytes in blood and lymphoid tissues.
Quantitation and specificity of binding

Clin.Exp.Immunol., 10, 581-597

Ernst P.B., A. Petit, A.D. Befus, D.A. Clark, K.L.

Rosenthal, T. Ishizaka und J. Bienenstock, 1985

Murine intestinal intraepithelial lymphocytes

II Comparison of freshly isolated and cultured
intraepithelial lymphocytes

Eur. J. Immunol., 15, 216-221

Fathman C.G., M. Small, L.A. Herzenberg und I.L. Weissman,
1975

Thymus cell Maturation

II Differentiation of three "mature" subclasses in vivo

Cell. Immunol., 15, 109-128

Feller A.C. und M.R. Parwaresch, 1983

Simultaneous enzyme-immunocytochemical detection of
antigens in monocellular specimens with monoclonal
antibodies

J. Immunol. Meth., 63, 273-279

Ford C.E., H.S. Micklem, E.P. Evans, J.G. Gray und D.A.
Ogden, 1966

The inflow of bone marrow cells to the thymus. Studies with
part body-irradiated mice injected with chromosome-marked
bone marrow and subjected to antigenic stimulation

Ann. N.Y. Acad Sci., 129, 283-296

Freitas A.A., B. Rocha und A.A. Coutinho, 1986
Lymphocyte population kinetics in the mouse
Immunol. Rev., 91, 5-37

Glasebrook A.L. und H.R. Mac Donald, 1983
Monoclonal anti-Lyt-2 antibodies block the activation of
cytolytic T lymphocyte precursors
J. Immunol., 130, 1552-1555

Hayakawa K., R.R. Hardy, D.R. Parks und L.A. Herzenberg,
1983
The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal, immunodeficient
and autoimmune mice
J. Exp. Med., 157, 202-218

Heitzmann H. und F.M. Richards, 1974
Use of the avidin-biotin complex for specific staining of
biological membranes in electron microscopy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3537-3541

Hildemann W.H., 1964
Immunological properties of small blood lymphocytes in the
graft-versus-host reaction in mice
Transplant., 2, 38-47

Hilgers J., J. Haverman, R. Nüsse, W.J. Van Blitterwijk,
F.J. Cleton, P.C. Hegeman, R. Van Nie und J. Calafat, 1975
Immunologic, virologic and genetic aspects of mammary tumor
virus induced cell surface antigens: Presence of these
antigens and the Thy-1.2 antigen on murine mammary gland
and tumor cells
J. Natl. Cancer Inst., 54, 1323-1333

Hoffmann-Fezer G., H. Rodt und S. Thierfelder, 1977
Immunohistochemical identification of T- and B-lymphocytes
delineated by the unlabeled antibody enzyme method. II.
Anatomical distribution of T- and B-cells in lymphoid
organs of nude mice
Beitr.Path., 161, 17-26

Hoffmann-Fezer G., D. Götze, H. Rodt und S. Thierfelder, 1978

Immunohistochemical localization of xenogeneic antibodies against Ia^k lymphocytes on B cells and reticular cells
Immunogenetics, 6, 367-377

Hoffmann-Fezer G, U. Kummer, I. Doxiadis, M. Eulitz und S. Thierfelder, 1982

Immunohistochemistry for screening hybridoma supernatants and double-labeling of cell-surface markers
Exp.Hematol.Today, 187-191

Hoffmann-Fezer G., 1986

Habilitationsarbeit, München

Hollander N., E. Pillemer und I.L. Weissman, 1981

Effect of Lyt antibodies on T-cell functions: Augmentation by anti-Lyt-1 as opposed to inhibition by anti-Lyt-2
Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78, 1148-1151

Hollander N., 1982

Effects of anti-Lyt antibodies on T cell functions
Immunol. Rev., 68, 44-66

Itakura K., J.J. Hutton, E.A. Boyse und L.J. Old, 1972

Genetic linkage relationships of loci specifying differentiation alloantigens in the mouse
Transplantation, 13, 239-243

Itakura K., J.J. Hutton, E.A. Boyse und L.J. Old, 1974

Linkage groups of the O and Ly-A loci
Nature New Biol., 230, 126

Jalkanen S., R.A. Reichert, W.M. Gallatin, R.F. Bargatze, I.L. Weissman und E.C. Butcher, 1986

Homing receptors and the control of lymphocyte migration
Immunol.Rev., 91, 39-60

John M., E. Carswell, E.A. Boyse und G. Alexander, 1972
Production of 0 antibody by mice that fail to reject
H-incompatible skin grafts
Nature New Biol., 238, 57-58

Jotereau F.V. und N.M. Le Douarin, 1982
Demonstration of a cyclic renewal of the lymphocyte
precursor cells in the quail thymus during embryonic and
perinatal life
J.Immunol., 129, 1869-1877

Kadish J.L. und R.S. Basch, 1976
Hematopoietic thymocyte precursors. I. Assay and kinetics
of the appearance of progeny
J.Exp.Med., 143, 1082-1099

Klein J.R., 1986
Ontogeny of the Thy-1⁻, Lyl-2⁺ murine intestinal
intraepithelial lymphocyte. Characterization of a unique
population of thymus-independent cytotoxic effector cells
in the intestinal mucosa
J.Exp.Med., 164, 309-314

Korngold R. und J. Sprent, 1985
Surface markers of T cells causing lethal graft-versus-host
disease to class I versus class II H-2 differences
J.Immunol., 135, 3004-3010

Kraal G., B. Van der Hilst und D. Boden, 1979
Functional and morphological recovery of the T cell
compartment in lethally irradiated and reconstituted mice
Immunology., 37, 195-201

Kuchel P.W., D.G. Cambell, A.N. Barclay und A.F. Williams,
1978
Molecular weights of the Thy-1 glycoproteins from rat
thymus and brain in the presence and absence of deoxycholate
Biochem.J., 169, 411-417

Kummer U., E. Thiel, I. Doxiadis, M. Eulitz, S. Sladoljev und S. Thierfelder, 1981

Tritium radiolabeling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl 2,3-³H propionate: Use in detecting monoclonal antibodies

J.Immunol.Meth., 42, 367-374

Kummer U., 1986

Tritium radiolabeling of antibodies to high specific activity with N-succinimidyl 2,3-³H propionate: Use in detecting and analyzing monoclonal antibodies

Met.Enzymol., 121, 670-679

Ledbetter J.A. und L.A. Herzenberg, 1979

Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens

Immunol. Rev., 47, 63-90

Ledbetter J.A., R.V. Rouse, H.S. Micklem und L.A. Herzenberg, 1980

T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens

J.Exp.Med., 152, 280-295

Ledbetter J.A., R.L. Evans, M. Lipinski, C.

Cunningham-Rundles, R.A. Good und L.A. Herzenberg, 1981a

Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man

J.Exp.Med., 153, 310-323

Ledbetter J.A., W.E. Seaman, T.T. Tsu und L.A. Herzenberg, 1981b

Lyt-2 and Lyt-3 antigens are on different polypeptide subunits linked by disulfide bonds: Relationship of subunits to T cell cytolytic activity

J.Exp.Med., 153, 1503-1516

Lepault F. und I.L. Weissman, 1981

An in vivo assay for thymus-homing bone marrow cells
Nature, 293, 151-154

Lögdberg L. und E.M. Shevach, 1985

Role of the Ly 1 antigen in interleukin 1-induced thymocyte
activation

Eur.J.Immunol. 15, 1007-1013

Lojda Z., R. Gossrau und T.H. Schiebler, 1976

Enzym-histochemische Methoden, p. 121-168

Loveland B.E., P.M. Hogarth, R.H. Ceredig und I.F.C.
McKenzie, 1981

Cells mediating graft rejection in the mouse. I. Lyt-1
cells mediate skin graft rejection

J.Exp.Med., 153, 1044-1057

Lüscher B., M. Rousseaux-Schmid, H.Y. Neim, H.R. MacDonald
und C.Bron, 1985

Biosynthesis and maturation of the Lyt-2/3 molecular
complex in mouse thymocytes

J.Immunol., 135, 1937-1944

Manohar V., E. Brown, W.M. Leiserson und T.M. Chused, 1982

Expression of Lyt-1 by a subset of B Lymphocytes

J.Immunol., 129, 532-538

Mason D.W. und A.F. Williams, 1980

The kinetics of antibody binding to membrane antigens in
solution and at the cell surface

Biochem.J., 187, 1-20

Mattes M.J., S.O. Sharrow, R.B. Herberman und H.T. Holden,
1979

Identification and separation of Thy-1 positive mouse
spleen cells active in natural cytotoxicity and
antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

J.Immunol., 123, 2851-2860

Mayrhofer G., 1980

Thymus-dependent and thymus-independent subpopulations of intestinal intraepithelial lymphocytes: A granular subpopulation of probable bone marrow origin and relationship to mucosal mast cells

Blood, 55, 532-535

Mazia D., G. Schatten und W. Sale, 1975

Adhesion of cells to surfaces coated with poly-lysine
J. Cell. Biol., 66, 198 200

McDevitt H.O., B.A. Askonas, J.H. Humphrey, I. Schechter und M. Sela, 1966

The localization of antigen in relation to specific antibody producing cells

I Use of a synthetic polypeptide (T,G-A-L) labeled with iodine-125

Immunology, 11, 337-351

McPhee D., J. Pye und K. Shortman, 1979

The differentiation of T lymphocytes

V. Evidence for intrathymic death of most thymocytes

Thymus, 1, 151-162

Micklem H., C. Clarke, E. Evans und C. Ford, 1968

Fate of chromosome-marked mouse bone marrow cells transfused into normal syngenic recipients

Transplantation 6, 299-302

Micklem H.S., D.A. Ogden, E.P. Evans, C.E. Ford und J.G. Gray, 1975

Compartments and cell flows within the mouse haemopoietic system.

II Estimated rates of interchange

Cell Tissue Kinet., 8, 233-248

Moore M.A.S., und J.J.T. Owen, 1967

Experimental studies on the development of the thymus
J.Exp.Med., 126, 715-726

Müller-Ruchholtz W., H.-U. Wottge und H.K.

Müller-Hermelink, 1976

Bone marrow transplantation in rats across strong
histocompatibility barriers by selective elimination of
lymphoid cells in donor marrow

Transplant. Proc., 8, 537-541

Nakayama E., H. Shiky, E. Stockert, H.F. Oettgen und L.J.
Old, 1979

Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing
activity by Lyt antisera

Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 76, 1977-1981

Nossal G.J.V., N.L. Warner, H. Lewis und J. Sprent, 1972

Quantitative features of a sandwich radioimmunolabeling
technique for lymphocyte surface receptors

J.Exp.Med., 135, 405-428

OKunewick J.P., R.F. Meredith, P.G. Braunschweiger, M.J.

Buffo, D.L. Jones und W.E. Beschorner, 1982

Definition and prevention of graft-versus-host disease with
the use of monoclonal antibodies

Exp.Hematol. 10, Supp.12, 12-22

Onoé K., R. Yasumizu, T. Oh-Ishi, M. Kakinuma, R.A. Good,
G. Fernandes und K. Marikawa, 1982

Specific elimination of the T lineage cells: Effect of in
vitro treatment with anti-Thy 1 serum without complement on
the adoptive cell transfer system

J.Immunol.Meth., 49, 315-322

Owen J.J. und M.A. Ritter, 1969

Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes
J.Exp.Med., 129, 431-437

Parks D.R., R.R. Hardy und LA. Herzenberg, 1983
Dual immunofluorescence - new frontiers in cell analysis
and sorting
Immunol.Today, 4, 145-150

Penit C., 1986
In vivo thymocytes maturation, BUdR labeling of cycling
thymocytes and phenotypic analysis of their progeny support
the single lineage model
J.Immunol. 137, 2115-2121

Petit A., P.B. Ernst, A.D. Befus, D.A. Clark, K.L.
Romenthal, T. Ishizaka und J. Bienenstock, 1985
Murine intestinal intraepithelial lymphocytes
I Relationship of a novel Thy-1⁻, Lyt-1⁻, Lyt-2⁺
granulated subpopulation to natural killer cells and mast
cells
Eur.J.Immunol., 15, 211-215

Pierres A., P. Naquet, A. VanAgthoven, F.Bekkhoucha, F.
Denizot, Z. Mishal, A.M. Schmitt-Verhulst und M. Pierres,
1984
A rat-anti-mouse T4 monoclonal antibody (H 129.19) inhibits
the proliferation of Ia-reactive T cell clones and
delineates two phenotypically distinct (T4⁺, Lyt 2,3⁻
and T4⁻Lyt2,3⁺) subsets among anti-Ia cytolytic T cell
clones
J. Immunol., 132, 2775-2782

Rabinovitch P.S., R.M. Torres und D. Engel, 1986
Simultaneous cell cycle analysis and two-color surface
immunofluorescence using 7-amino-actinomycin D and single
laser excitation: Applications to study of cell activation
and the cell cycle of murine Ly-1 B cells
J.Immunol., 136, 2769-2775

Raedler A., E. Raedler, W-M. Becker, R. Arndt und H.G. Thiele, 1982

Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin

Immunology, 46, 321-328

Raff M.C. und H.H. Woprtis, 1970

Thymus dependence of Φ -bearing cells in the peripheral lymphoid tissues of mice

Immunology, 18, 931-942

Reif A.E. und J.M.V. Allen, 1964

The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues

J.Exp.Med., 120, 413-432

Rodt H.V., S. Thierfelder und M. Eulitz, 1972

Suppression of acute secondary disease by heterologous anti-brain serum

Blut, 25, 385-389

Rozing J., N.H.C. Brons, W. VanEwijk und R. Benner, 1978

B lymphocyte differentiation in lethally irradiated and reconstituted mice

Cell.Tiss.Res., 189, 19-30

Sarmiento M., A.L. Glasebrook und F.W. Fitch, 1980

IgG or IgM monoclonal antibodies reactive with different determinants on the molecular complex bearing Lyt-2 antigen block T cell-mediated cytolysis in the absence of complement

J.Immunol., 125, 2665-2672

Sato V.L., S.D. Waksal und L.A. Herzenberg

Identification and separation of pre T-cells from nu/nu mice: Differentiation by preculture with thymic reticuloepithelial cells

Cell. Immunol., 24, 173-185

Schaefer H.E. und R. Fischer, 1968

Der Peroxidasenachweis an Ausstrichpräparaten sowie an Gewebeschnitten nach Entkalkung und Paraffineinbettung
Klin. Wschr., 22, 1228-1230

Scheid M., E.A. Boyse, E.A. Carswell und L.J. Old, 1972

Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells

J.Exp.Med., 135, 938-955

Schmid W., 1965

Autoradiography of human chromosomes

In: Human Chromosome methodology, ed. J.J. Yunis, p. 91-110

Scollay R.G., 1982

Ontogeny of Lyt-1 and Lyt-123 subsets in the thymus

In vivo immunology: Histophysiology of the lymphoid system.

Ed. M.G. Hanna Plenum NY, p. 365

Scollay R.G., E.C. Butcher und I.L. Weissman, 1980

Thymus cell migration, Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice

Eur.J.Immunol., 10, 210-218

Scollay R. und K. Shortman, 1983

Thymocyte subpopulations: an experimental review including flow cytometric cross-correlations between the major murine thymocyte markers

Thymus, 5, 245-295

Scollay R., A. Wilson und K. Shortman, 1984

Thymus cell migration: Analysis of thymus emigrants with markers that distinguish medullary thymocytes from peripheral T cells

J.Immunol., 132, 1089-1094

Shortman K., K.T. Brunner und J.-C. Cerottini, 1972
Separation of stages in the development of the "T" cells
involved in cell-mediated immunity
J.Exp.Med., 135, 1375-1392

Shortman K. und H. Jackson, 1974
The differentiation of T lymphocytes
I Proliferation kinetics and interrelationships of
subpopulations of mouse thymus cells
Cell.Immunol., 12, 230-246

Silobrčić V., B. Vitale, M. Šušnjić, V. Tomažić und I.
Bašić, 1976
Acute graft-versus-host reaction in mice
3. Organ distribution of injected 51 chromium labeled
lymphocytes
Exp.Hematol., 4, 103-113

Simonsen M., 1962
Graft-versus-host reactions. Their natural history and
applicability as tools of research
Prog. Allergy, 6, 349-378

Smithyman A.M., 1977
A combined autoradiography-immunofluorescence technique for
the study of lymphocyte traffic in relation to antigen
localization
J.Immunol.Meth., 17, 217-223

Snell G.D. und M. Cherry, 1971
Genetic factors in leukemia. Loci determining cell surface
alloantigens; in Emmelot, Bentvelzen, RNA viruses and host
genome in oncogenesis, p. 221-228

Stern P.L., 1973
O alloantigens on mouse and rat fibroblasts
Nature New Biol., 246, 76-78

Swain S.L., 1981

Significance of Lyt phenotypes: Lyt-2 antibodies block activities of T cells that recognize class I major histocompatibility complex antigens regardless of their function.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71, 7101-7105

Swain S.L., D.P. Dialynas, F.W. Fitch und M. English, 1984
Monoclonal antibody to L3T4 blocks the function of T cells specific for class 2 major histocompatibility complex antigens

J.Immunol., 132, 1118-1123

Tabibzadeh S.S. und M.A. Gerber, 1986

Immunohistologic analysis of lymphoid cells by a rapid double staining method

J.Immunol.Meth., 91, 169-174

Taub R.N. und E.M. Lance, 1971

Effects of lymphoid depletion on the distribution of ⁵¹Cr-labeled lymph node cells in mice

Transplantation, 11, 536-542

Thiel E., P. Dörmer, H. Rodt und S. Thierfelder, 1975

Quantitative immunoautoradiography at the cellular level.

I. Design of a microphotometric method to quantitative membrane antigens on single cells using ¹²⁵J-labeled antibodies

J.Immunol.Meth., 6, 317-330

Thiel, E., P. Dörmer, W. Ruppelt und S. Thierfelder, 1976

Quantitative immunoautoradiography at the cellular level.

II. Absolute measurements using labeled standard cells as a source of reference

J.Immunol.Meth., 12, 237-251

Thierfelder S., G. Hoffmann-Fezer, H. Rodt und U. Kummer,
1982

Cell manipulation with antibodies: Differential effects of
anti-T and ATG
Exp.Hematol.Today, 103-109

Thierfelder S., S. Cobbold, U. Kummer, H. Waldmann und R.
Schuh, 1985

Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VII.
Two out of nine monoclonal anti-Thy-1 antibodies used for
pretreatment of donor marrow suppressed graft-versus-host
reactions without added complement
Exp.Hematol., 13, 948-955

Thierfelder S., U. Kummer und G. Hoffmann-Fezer
Anti-Thy-1 in bone marrow transplantation
In: Thy-1: Immunology, Neurology, and Applications for
Diagnosis and Therapy. Marcel Dekker Inc., New York. Ed. E.
Reif und M. Schlesinger, (in press)

Thomas Y., E. Glickman, J. DeMartino, J.Wang, G. Goldstein
und L. Chess, 1984
Biologic functions of the OKT1 T cell surface antigen
I The T1 molecule is involved in helper function
J.Immunol., 133, 724-728

Tourvieille B., S.D. Gorman, E.H. Field, T. Hunkapiller und
J.R. Parnes, 1986
Isolation and sequence of L3T4 complementary DNA clones:
Expression in T cells and brain
Science, 234, 610-613

Trentin J.J. und K.P. Judd, 1973
Prevention of acute graft-versus-host (GvH) mortality with
spleen-absorbed antithymocyte globulin (ATG)
Transplant.Proc., 5, 865-868

Vallera D.A., C.C.B. Soderling, G.J. Carlson und J.H. Kersey, 1981

Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. Effect of elimination of T cells from donor grafts by treatment with monoclonal Thy-1.2 plus complement or antibody alone

Transplantation, 31, 218-222

Vallera D.A., C.C.B. Soderling und J.H. Kersey, 1982

Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. III Treatment of donor grafts with monoclonal antibodies directed against Lyt determinants

J. Immunol., 128, 871-875

Van Ewijk W., R.V. Rouse und I.L. Weissman, 1980

Distribution of H-2 microenvironments in the mouse thymus. Immunoelectron microscopic identification of I-A and H-2K bearing cells

J.Histochem.Cytochem., 28, 1089-1099

Van Ewijk W., P.L. Van Soest und G.J. Van Den Engh, 1981

Fluorescence analysis and anatomic distribution of mouse T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies to the antigens Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, and T-200

J.Immunol., 127, 2594-2604

Van Rooijen N., und J.G. Streefkerk, 1976

Autoradiography and immunohistoperoxidase techniques applied to the same tissue section

J.Immunol.Meth., 10, 379-383

Van Rooijen N., N. Kors, D.M. Boorsma, P. De Haan und R. Van Nieuwmegen, 1984a

Double immunocytochemical staining in the study of antibody-producing cells in vivo. Simultaneous detection of anti-hapten and anti-carrier antibody producing cells in lymphoid tissue

Immunology, 51, 417-421

Vallera D.A., C.C.B. Soderling, G.J. Carlson und J.H. Kersey, 1981

Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. Effect of elimination of T cells from donor grafts by treatment with monoclonal Thy-1.2 plus complement or antibody alone

Transplantation, 31, 218-222

Vallera D.A., C.C.B Soderling und J.H. Kersey, 1982

Bone marrow transplantation across major histocompatibility barriers in mice. III Treatment of donor grafts with monoclonal antibodies directed against Lyt determinants

J. Immunol., 128, 871-875

Van Ewijk W., R.V. Rouse und I.L. Weissman, 1980

Distribution of H-2 microenvironments in the mouse thymus. Immunoelectron microscopic identification of I-A and H-2K bearing cells

J.Histochem.Cytochem., 28, 1089-1099

Van Ewijk W., P.L. Van Soest und G.J. Van Den Engh, 1981

Fluorescence analysis and anatomic distribution of mouse T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies to the antigens Thy-1, Lyt-1, Lyt-2, and T-200

J.Immunol., 127, 2594-2604

Van Rooijen N., und J.G, Streefkerk, 1976

Autoradiography and immunohistoperoxidase techniques applied to the same tissue section

J.Immunol.Meth., 10, 379-383

Van Rooijen, N., N. Kors und R. Van Nieuwmengen, 1984b
Double immunocytochemical staining in the study of
antibody-producing cells in vivo. Simultaneous detection of
cells producing monospecific antibodies and cells producing
cross-reacting antibodies in the spleen of rabbits after
injection of two related antigens
J.Histochem.Cytochem., 32, 844-848

Viktora L., J. Fiala und E. Hermanova, 1978
Transplantation of bone marrow cells to lethally irradiated
mice. Time-dependent morphological changes in the spleen
and bone marrow
Scand.J.Haematol., 20, 13-17

Vitale B., B. Jakšić, M. Matošić, U. Silobrcić und U.
Tomažić, 1976
Acute graft-versus-host reaction in mice. I. Cellular events
Transplantation, 21 502-510

Walker I.D., B.J. Murray, P.H. Hogarth, A. Kelso und I.F.C.
McKenzie, 1984
Comparison of thymic and peripheral T cell Lyt-2/3 antigens
Eur.J.Immunol., 14, 906-910

Wilde D.B., P. Marrack, J. Kappler, D.P. Dialynas und F.W.
Fitch, 1983

Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen
reactivity; monoclonal antibody GK 1.5 (anti-L3T4a) blocks
class II MHC antigen specific proliferation, release of
lymphokines, and binding by cloned murine helper T
lymphocyte lines
J.Immunol., 131, 2178-2183

Williams A.F. und J. Gagnon, 1982
Neuronal cell Thy-1 glycoprotein: Homology with
immunoglobulin
Science, 216, 696-703

Wilson M.B. und P.K. Nakane, 1978

Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase

In: Immunofluorescence and related staining techniques

Eds: W. Knapp, H. Holubar & G. Wick

(Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam)

pp 215-225

Wolters E.A.J und R. Benner, 1978

Immunobiology of the graft-versus-host reaction. I. Symptoms of graft-versus-host disease in mice are preceded by delayed type hypersensitivity to host histocompatibility antigens

Transplantation, 26, 40-45

Zinkernagel R.M., G.N. Callahan, J. Klein und G. Dennert, 1978

Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus

Nature, 271, 251-253

SUMMARY

T cell antigen analysis using a simultaneous cytochemical and autoradiographic detection of different antibodies with a special consideration of GvH disease.

We have developed a double labeling method to detect simultaneously two different antigens on single cells. It is a new combination of two systems, immunocytochemistry and ^3H immunoautoradiography, applied on cells previously fixed on Poly-L-lysine (PLL) coated multispot slides. For more precise results, tritium instead of iodine has been used, due to its longer half life, its lower radiation hazard, and its closer localisation of silver grains to the cell-bound antibodies resulting from its short radiation range.

While immunocytochemical assays using differently coloured labels risk colour mixtures which are difficult to classify, the main advantage of our method is the clear distinction of cells specifically labeled with two different antibodies from cells labeled with only one of the antibodies. The cells and the markers are visible by light microscopy under the same light conditions which allows simultaneous morphological classification.

In this study we applied a tritium labeled anti-Thy-1.1 together with anti Lyt-1, Lyt-2 or L3T4 antibodies to examine the distribution of the corresponding antigens on mouse lymphocytes. Because of the high sensitivity of the method we found phenotypes of small populations of cells which could not have been directly revealed before.

This study showed that no single antibody can provide adequate definition or give really clean separation of any lymphocyte subpopulation. For a tight unequivocal definition of the lymphocyte subpopulations and a better understanding of the cell interactions which initiate and control immune responses a multiparameter characterisation is required. Since it should be also correlated with the functional properties of the cells, the third part of this

study presents an analysis of the normal lymphocyte differentiation after a syngeneic bone marrow transplantation and the altered lymphocyte differentiation in GvH disease. We took advantage of the antigenic polymorphism in Thy-1 expression in mice which is not known in other species. That allowed the distinction of graft (Thy-1.1⁺) as opposed to host (Thy-1.2⁺) lymphocytes. By means of the new double labelling method it was possible to detect the grafted lymphocytes and their membrane characteristics. When the lymphocytes were transplanted into an allogeneic host (AKR/J $\longrightarrow$ C57BL/6) they were stimulated to proliferate and cause an acute GvH disease. The analysis of the spleen cells showed that although both, Lyt-2⁺ and Lyt-2⁻, lymphocyte subpopulations increased drastically, their ratio (Lyt-2⁺: Lyt-2⁻) was 2,5:1, which is the inversion of the normal lymphocyte ratio (1:2) in the spleen.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF) München in der Zeit vom Februar 1984 bis März 1987 durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.S. Thierfelder möchte ich danken, daß er diese Untersuchungen ermöglichte und großzügig förderte, sowie den Ablauf der Untersuchungen mit wissenschaftlicher Anteilnahme unterstützte.

Herrn Prof.Dr.F. Schwarzfischer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und stetige Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr.R. Munker danke ich besonders für die Einführung in die Arbeitstechniken.

Frau Dr.G.Hoffmann-Fezer möchte ich danken für die Hilfestellung in den immunhistologischen Untersuchungen und die Durchsicht des Manuskriptes, ihre freundliche Kooperation und die jederzeit bereitwillige Unterstützung.

Für die Hilfestellung im Tritiumkoppelungsverfahren gilt mein Dank Herrn Dr.U. Kummer und Herrn R.Schuh.

Herrn Prof.Dr.P. Dörmer danke ich für die Hilfe bei photometrischen Messungen, die ich in dem von ihm geleiteten Institut für Experimentelle Hämatologie der GSF in großzügiger Weise durchführen konnte.

Herrn Prof.Dr.B. Vitale, der richtungsweisend für mich war, danke ich für die Ratschläge, die eine Verbindung meiner Arbeit mit der Problematik unserer Arbeitsgruppe in meinem Heimatinstitut "Ruder Boskovic" aufrechterhalten hat.

Für seine stetige Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente und die kritische Durchsicht des Manuskriptes danke ich Herrn J.Mysliwietz.

Für die technische Hilfe danke ich den Assistentinnen des Institutes für Immunologie.

Für die grammatikalischen Korrekturen möchte ich Herrn Dr.M. Heiss und Frau M.Einberger danken, letzterer ganz besonders für die hilfreiche Unterstützung bei den erforderlichen Vorarbeiten.

Danken möchte ich auch Frau M.Vrbova für die Unterstützung bei der Ausführung der graphischen Abbildungen.

Bei den aufwendigen Schreibarbeiten konnte ich auf Frau S.Donhauser und Frau B.Engelbrecht zählen, denen ich sehr dafür danke.

Für ihre freundliche Hilfe danke ich der Bibliothekarin des Institutes, Frau S.Salrein.

Insbesondere danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für ihre Freundlichkeit, die mir einen erfolgreichen Aufenthalt ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich herzlich Frau M.Kovacic, Frau M.Sc.L.Cicin-Sain und Frau M.Sc.Lj.Kunst für ihr Verständnis und moralische Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name:	Mariastefania Antica
Geburtstag:	21.6.1958
Geburtsort:	Zadar (Jugoslawien)
Familienstand:	Ledig
Schulbildung:	
1964 - 1972	Grundschule in Biograd n/m
1972 - 1976	Gymnasium in Zadar
Berufsausbildung:	
1976 - 1981	Biologiestudium an der Universität in Zagreb
	Abschluß: Diplom
1981 - 1983	Magisterarbeit an der Naturwissenschaftlichen Universität in Zagreb
	Abschluß: Magisterarbeit
1984 - 1987	Doktorarbeit bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Institut für Immunologie in München

Seit September 1982 habe ich eine feste Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Experimentelle Biologie und Medizin am Institut "Rudjer Boskovic", Zagreb. Ich wurde ab Februar 1984 für 3 Jahre vom Institut "Rudjer Boskovic" für meine Dissertation in der GSF in München freigestellt.

